

Detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* por nested polymerase chain reaction em espécimes pulmonares e extrapulmonares*

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by nested polymerase chain reaction in pulmonary and extrapulmonary specimens

Adriana Antônia da Cruz Furini, Heloisa da Silveira Paro Pedro,
Jean Francisco Rodrigues, Lilian Maria Lapa Montenegro,
Ricardo Luiz Dantas Machado, Célia Franco, Haiana Charifker Schindler,
Ida Maria Foschiani Dias Batista, Andrea Regina Baptista Rossit

Resumo

Objetivo: Comparar o desempenho da técnica *nested polymerase chain reaction* (NPCR) com aquele de culturas na detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em espécimes pulmonares e extrapulmonares. **Métodos:** Analisamos 20 e 78 espécimes pulmonares e extrapulmonares, respectivamente, de 67 pacientes hospitalizados com suspeita de tuberculose. Um sistema automatizado foi utilizado na identificação de culturas de *Mycobacterium* spp., e *M. tuberculosis* IS6110 foi utilizada como sequência alvo na NPCR. A estatística kappa foi utilizada para verificar a concordância entre os resultados. **Resultados:** Entre os 67 pacientes, 6 e 5, respectivamente foram diagnosticados com tuberculose pulmonar e extrapulmonar, e a NPCR foi positiva em todos os casos. Entre os 98 espécimes clínicos, a baciloscopia, cultura e NPCR foram positivas em 6,00%, 8,16% e 13,26%, respectivamente. Comparando-se os resultados da NPCR com aqueles da cultura (padrão ouro) nos espécimes pulmonares, a sensibilidade e a especificidade foram 100% e 83%, respectivamente, enquanto essas nos espécimes extrapulmonares foram 83% e 96% respectivamente, com boa concordância entre os testes (kappa, 0,50 e 0,6867, respectivamente). **Conclusões:** Embora a NPCR tenha se mostrado uma ferramenta muito útil na detecção do complexo *M. tuberculosis*, No entanto, os resultados positivos da NPCR devem ser associados à clínica, dados clínicos, epidemiológicos e outros dados laboratoriais devem também ser considerados no diagnóstico e tratamento da tuberculose pulmonar e extrapulmonar.

Descritores: Tuberculose/diagnóstico; Tuberculose/microbiologia; *Mycobacterium tuberculosis*; Reação em cadeia da polimerase.

Abstract

Objective: To compare the performance of nested polymerase chain reaction (NPCR) with that of cultures in the detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in pulmonary and extrapulmonary specimens. **Methods:** We analyzed 20 and 78 pulmonary and extrapulmonary specimens, respectively, of 67 hospitalized patients suspected of having tuberculosis. An automated microbial system was used for the identification of *Mycobacterium* spp. cultures, and *M. tuberculosis* IS6110 was used as the target sequence in the NPCR. The kappa statistic was used in order to assess the level of agreement among the results. **Results:** Among the 67 patients, 6 and 5, respectively, were diagnosed with pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, and the NPCR was positive in all of the cases. Among the 98 clinical specimens, smear microscopy, culture, and NPCR were positive in 6.00%, 8.16%, and 13.26%, respectively. Comparing the results of NPCR with those of cultures (the gold standard), we found that NPCR had a sensitivity and specificity of 100% and 83%, respectively, in pulmonary specimens, compared with 83% and 96%, respectively, in extrapulmonary specimens, with good concordance between the tests (kappa, 0.50 and 0.6867, respectively). **Conclusions:** Although NPCR proved to be a very useful tool for the detection of *M. tuberculosis* complex, clinical, epidemiological, and other laboratory data should also be considered in the diagnosis and treatment of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis.

Keywords: Tuberculosis/diagnosis; Tuberculosis/microbiology; *Mycobacterium tuberculosis*; Polymerase chain reaction.

*Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; no Setor de Micobactérias, Instituto Adolfo Lutz, São José do Rio Preto (SP) Brasil; e no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife (PE) Brasil.

Endereço para correspondência: Heloisa da Silveira Paro Pedro. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, CEP 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Tel. 55 17 3224-2602. E-mail: hsppedro@ial.sp.gov.br

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Processo nº 576297/2008-9).

Recebido para publicação em 1/2/2013. Aprovado, após revisão, em 24/9/2013.

Introdução

A Organização Mundial da Saúde estima que houve entre 8,8 e 9,2 milhões de casos novos de tuberculose em 2010.⁽¹⁾ Além disso, estima-se que 1,2 milhão desses casos estejam infectados pelo HIV. Ademais, estima-se que 1,1 milhão de óbitos ocorreram em pacientes com tuberculose HIV negativos, o que equivale a 15 óbitos por 100.000 habitantes. A mortalidade é o indicador mais sensível de medidas de controle da tuberculose⁽²⁾; a tuberculose continua a figurar entre as dez principais causas de óbito em todo o mundo. A meta de cura de 85% dos casos de tuberculose, estabelecida pela Assembleia Mundial da Saúde em 1991, não foi alcançada em 2009 em 7 dos 22 países com maior carga da doença, incluindo o Brasil (72%).⁽³⁾

O diagnóstico em fase precoce da doença é de suma importância para o início do tratamento, com consequências diretas para o controle individual da doença e, conseqüentemente, para ações de saúde pública voltadas à prevenção da transmissão da tuberculose. Portanto, é necessário que os laboratórios de microbiologia clínica sejam capazes de identificar rapidamente as micobactérias por meio de microscopia e cultura. Porém, o exame de escarro, embora rápido e custo-efetivo, tem baixa sensibilidade e especificidade, particularmente em amostras paucibacilares, e a cultura, embora seja considerada o padrão ouro em razão de sua alta sensibilidade, requer várias semanas para produzir um resultado.⁽⁴⁻⁸⁾

Atualmente, o Brasil é um dos países que, juntos, concentram 80% dos casos de tuberculose no mundo, com uma incidência de 70.977 casos em 2010.^(4,6) Para a maioria desses casos, o diagnóstico foi baseado apenas nos resultados dos exames de escarro; radiografias de tórax, culturas e testes bioquímicos para *Mycobacterium* spp. apenas foram realizados em pacientes com exames de escarro negativos mas com sintomas respiratórios.^(8,9) Essas limitações diagnósticas têm estimulado o uso de ferramentas moleculares com maior sensibilidade, especificidade e velocidade com o objetivo de detectar micobactérias em todos os espécimes clínicos.^(5-8,10) As novas tecnologias que estão sendo desenvolvidas redefiniram recentemente o diagnóstico de tuberculose, fornecendo uma base para técnicas laboratoriais de diagnóstico.^(5,8) O diagnóstico molecular da tuberculose por *polymerase chain reaction* (PCR, reação em cadeia da polimerase) com *primers* de

alta especificidade (98%), com amplas variações de sensibilidade (20-100%), tem sido utilizado para a identificação de alvos genéticos no bacilo.^(7,11,12)

Apesar do uso difundido da PCR convencional, modificações na técnica, tais como o acréscimo de uma reação adicional (*nested* PCR), aumentaram sua sensibilidade e especificidade.⁽⁶⁾ É possível que isso se deva ao fato de que são diluídos potenciais inibidores da PCR, que comumente estão presentes em amostras biológicas.⁽¹¹⁾ Portanto, a possibilidade de acesso a uma ferramenta molecular que leva a um diagnóstico mais rápido e que é eficaz na detecção de casos difíceis de elucidar por meio de testes convencionais certamente ajuda a diminuir a morbidade e melhorar o controle da tuberculose. O objetivo do presente estudo foi avaliar a técnica de *nested* PCR dirigida à sequência de inserção IS6110 no *Mycobacterium tuberculosis* e comparar os resultados com aqueles obtidos em culturas de amostras de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar ou extrapulmonar.

Métodos

Este estudo foi realizado entre fevereiro e dezembro de 2009. Os pacientes incluídos no estudo foram submetidos a avaliação física e coleta de amostras no Hospital de Base, um centro de referência para o diagnóstico e tratamento da tuberculose localizado na cidade de São José do Rio Preto (SP). Os dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos de prontuários médicos de acordo com um protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Protocolo nº 064/2009). A presença de anticorpos anti-HIV, identificada por ELISA e confirmada por Western blot, foi indicativa de soropositividade para HIV.

Todos os pacientes incluídos no estudo eram maiores de 18 anos de idade, eram imunossuprimidos (em razão de terapia de imunossupressão, doença autoimune, transplante de órgãos ou positividade para HIV) e apresentavam sintomas e sinais clínicos sugestivos de tuberculose pulmonar ou extrapulmonar. Nossa amostra foi composta por 67 pacientes hospitalizados, e 98 espécimes clínicos foram coletados, dos quais 20 eram espécimes pulmonares (escarro, LBA ou lavado gástrico) e 78 eram espécimes extrapulmonares (sangue, líquido cefalorraquidiano, aspirado de linfonodo, urina, líquido pleural, secreção ganglionar, fragmento pleural, fragmento hepático, líquido ascítico, aspirado de medula

óssea ou espécimes de biópsia). O número de espécimes coletados dos pacientes variou de um a três, de acordo com as solicitações médicas. A confirmação do diagnóstico de tuberculose baseou-se nos seguintes critérios: evidências clínicas e radiológicas de tuberculose confirmadas por testes laboratoriais, isolamento de *M. tuberculosis* em espécimes clínicos por baciloscopia direta ou cultura (padrão ouro) e melhora clínica evidente após tratamento com agentes antimicobacterianos.

Em suma, a baciloscopia direta foi realizada com a coloração de Ziehl-Neelsen, e utilizou-se um sistema automatizado de detecção microbiana (BacT/ALERT MP; Organon Teknika Corp., Durham, NC, EUA) para a identificação do *Mycobacterium* spp. nas culturas. As cepas foram identificadas por métodos fenotípicos.⁽¹³⁾ A genotipagem foi realizada por meio de análise por enzimas de restrição por PCR de acordo com Chimara et al.,⁽¹⁴⁾ embora com modificações.

Amostras de sangue foram coletadas em tubos de 5 mL contendo EDTA, e células mononucleares de sangue periférico foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade (Ficoll-Histopaque) para futura extração de DNA.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ Para órgãos sólidos, foram coletadas amostras de punção de biópsia (2.0 mm). Todas as amostras clínicas foram mantidas a -20°C até a extração do DNA, que foi realizada de acordo com o método descrito por Rossetti et al.⁽¹⁸⁾ com modificações por Lima et al.^(11,18,19) Em suma, uma alíquota de 500 μL da amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 min e submetida a três lavagens com Tris-EDTA (TE). O sedimento foi ressuspenso em 100 μL de TE e aquecido a 100°C por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo diferente, e foram adicionados 5 μL de resina (Sephaglas BandPrep Kit; Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia); uma alíquota de solução de iodeto de sódio (0,9 g/mL) foi adicionada ao volume final. O tubo foi agitado por 5 min e incubado à temperatura ambiente por 5 min. Após a centrifugação do tubo por 1 min e o descarte do sobrenadante, foram adicionados 200 μL de etanol gelado a 70%; o tubo foi então agitado, sendo posteriormente centrifugado por 1 min. O sedimento resultante foi mantido à temperatura ambiente por 60 min, para completar o processo de secagem, e ressuspenso em 40 μL de $1\times\text{TE}$. O tubo foi incubado em banho de água a 50°C por 10 min. Em seguida, o tubo

foi centrifugado por 1 min, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo e armazenado a -20°C até o processamento.^(11,18)

Para as *nested* PCRs, utilizou-se IS6110 do *M. tuberculosis* como sequência alvo (GenBank nº de acesso NP 215310.1). As reações foram realizadas de acordo com Ritis et al.⁽¹⁷⁾ Os seguintes *primers* foram utilizados: *sense* (TJ3 5'-ATC CCC TAT CCG TAT GGT G-3'); *antisense* (TJ5 5'-CCG CAA AGT GTG GCT AAC-3'); *sense* (*STAN3* 5'-GTC GAG TAC GCC TTC TTG TT-3'); e *antisense* (*OLI 5* 5'-AAC GGC TGA TGA CCA AAC-3'). A PCR utilizou um volume final de 50 μL ($1\times$ tampão, 50 mM de MgCl_2 , 10 pmol/ μL de cada oligonucleotídeo, 0,2 μM de dNTP e 2 U de Taq DNA polimerase [Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA]). O processo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 min, 30 ciclos de desnaturação (a 94°C por 1 min, 57°C por 1 min e 72°C por 1 min), seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 min. A segunda PCR foi realizada com 3 μL do produto da primeira PCR em condições semelhantes às descritas anteriormente, mas com temperatura de recozimento de 60°C . DNA da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv e mistura de PCR isoladamente foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (Fisher-Biotech, Fairlawn, NJ, EUA), resultando em um fragmento de 316 bp.

As análises estatísticas foram realizadas com o pacote estatístico Epi Info, versão 6.0. A estatística kappa foi utilizada para verificar a concordância entre os resultados.⁽²⁰⁾ O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

Nossa amostra foi composta por 67 indivíduos, sendo que 63,7% eram do sexo masculino. A média de idade dos pacientes foi de $40,10 \pm 3,66$ anos (variação: 18-87 anos). A comorbidade mais frequente foi HIV/AIDS, em 41 pacientes.

A tuberculose foi diagnosticada em 11 pacientes (16,41%), sendo que 5 foram diagnosticados com tuberculose pulmonar e os restantes, com tuberculose extrapulmonar (tuberculose pleural em 3, tuberculose meningea em 2 e tuberculose miliar em 1). Todos os isolados de cultura foram confirmados por genotipagem de *M. tuberculosis*.

A *nested* PCR foi positiva em todos os casos de tuberculose confirmada, como mostra a Tabela 1. Em 4 dos pacientes com tuberculose, resultados laboratoriais positivos foram obtidos apenas pela técnica molecular ($p = 0,110$; teste exato de Fisher).

Dos 98 espécimes clínicos analisados, 6,00%, 8,16% e 13,26%, respectivamente, apresentaram resultados positivos na baciloscopia, cultura e *nested* PCR, como resumido na Tabela 1. A cultura foi negativa em 2 das amostras com baciloscopia positiva, enquanto a baciloscopia foi negativa em 4 das amostras com cultura positiva.

Ao se comparar os resultados da *nested* PCR com aqueles das culturas em amostras pulmonares (Tabela 2), constatou-se que a sensibilidade e a especificidade da *nested* PCR foram 100% e 83%, respectivamente. Os valores preditivos positivo e negativo foram 40% e 100%, respectivamente,

com boa concordância entre os testes ($kappa = 0,50$; $p = 0,25$; teste de McNemar). Com relação às amostras extrapulmonares (Tabela 2), a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo foram, respectivamente, 83,0%, 96,0%, 62,5% e 98,5%, com boa concordância entre os testes ($kappa = 0,6867$; $p = 0,625$; teste de McNemar).

Discussão

O diagnóstico precoce da tuberculose é essencial para o tratamento imediato e o controle efetivo da doença.⁽⁵⁾ Isso é particularmente verdadeiro em casos de tuberculose extrapulmonar, pois vários fatores podem complicar o diagnóstico da doença. Em razão da natureza paucibacilar da tuberculose extrapulmonar, estudos mostram uma variabilidade nos resultados positivos em cultura (de 12% a

Tabela 1 - Dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos onze pacientes com tuberculose pulmonar ou extrapulmonar confirmada.

Paciente ^a	Forma de tuberculose	Tipo de amostra	Resultados			Desfecho
			Baciloscopia	Cultura	<i>Nested</i> PCR	
1	Pulmonar	Sangue	-	-	+	Óbito/NTB
2	Pulmonar	Sangue	-	-	+	Cura
3	Pleural	Sangue	-	-	+	Óbito/NTB
4	Pleural	Líquido pleural	+	-	+	Cura
5	Pulmonar	Sangue	+	+	+	Óbito/TB
6	Pulmonar	Escarro	+	-	+	Óbito/NTB
7	Pulmonar	Escarro	+	+	+	Cura
		LCR	+	+	+	
		Sangue	-	-	-	
8	Meníngea	LCR	-	+	+	Cura
9	Meníngea	LCR	-	+	+	Cura
10	Miliar	Escarro	+	+	+	Óbito/NTB
		LCR	-	+	-	
		Sangue	-	+	+	
11	Pleural	Líquido pleural	-	-	+	Abandono

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase); Óbito/NTB: óbito por outra causa (não tuberculose); Óbito/TB: óbito por tuberculose; e LCR: líquido cefalorraquidiano. ^aPacientes 1 a 4 eram HIV negativos, e pacientes 5 a 11 eram HIV positivos. Cultura vs. *nested* PCR (negativa/positiva): $7 \times 8/2 \times 13$ ($p = 0,110$; teste exato de Fisher).

Tabela 2 - Cultura e *nested polymerase chain reaction* para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras pulmonares e extrapulmonares.

<i>Nested</i> PCR	Cultura				Total
	Amostras extrapulmonares		Amostras pulmonares		
	(n = 78)		(n = 20)		
	(+)	(-)	(+)	(-)	
(+)	5	3	2	3	13
(-)	1	69	0	15	85
Total	6	72	2	18	98

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase).

80%) e uma variedade de amostras clínicas/tecidos biológicos, o que implica uma distribuição não uniforme do bacilo, bem como a presença de sinais e sintomas não específicos.^(10,12,19-21) Em nosso estudo, a tuberculose pleural foi diagnosticada em 2 pacientes HIV negativos, corroborando os achados de um estudo que revelou que a tuberculose pleural é prevalente em casos extrapulmonares em pacientes HIV negativos.⁽²²⁾ Cerca de 50% dos indivíduos HIV positivos portadores de tuberculose desenvolvem formas extrapulmonares.^(12,20,21,23) Apesar do pequeno número de pacientes HIV positivos incluído no presente estudo, nossos resultados mostram uma predominância de tuberculose extrapulmonar (57%).

Vários testes baseados em técnicas de PCR com uso de kits comerciais e testes *in house* estão sendo avaliados. A técnica *nested* PCR, ao visar *IS6110* com o objetivo de identificar o complexo *M. tuberculosis*,⁽⁴⁾ proporciona sensibilidade e especificidade variáveis, dependendo do laboratório, do espécime clínico, da carga bacilar, da lise celular e dos parâmetros técnicos.⁽¹⁰⁾ As técnicas moleculares melhoraram muito a detecção de micobactérias em linfonodos e em vários fluidos corporais (aspirados, líquido cefalorraquidiano, líquido ascítico e líquido pleural). Porém, em razão da sensibilidade e especificidade variáveis em diferentes estudos, os resultados positivos devem ser interpretados em conjunto com os achados clínicos.⁽²¹⁾ No presente estudo, a proporção de resultados positivos na *nested* PCR nos indivíduos diagnosticados com tuberculose pulmonar ou extrapulmonar (100%) foi maior do que em outros estudos utilizando o mesmo gene alvo realizados no Brasil,⁽⁶⁾ Índia⁽²¹⁾ e Grécia.⁽¹⁷⁾

É possível que a discordância entre o método molecular e a baciloscopia nas amostras pulmonares e extrapulmonares em nosso estudo (em 1 e em 6 amostras, respectivamente) esteja diretamente relacionada à baixa sensibilidade da técnica de fenotipagem, à natureza paucibacilar das amostras ou até à ausência de infecção por BAAR, como observado por outros autores.^(12,15,20) Negi et al.⁽¹⁹⁾ relataram que uma técnica molecular direcionada a *IS6110* apresentou alta positividade em amostras pulmonares e extrapulmonares (90% e 77%, respectivamente), enquanto a baciloscopia apresentou baixa positividade (49% e 24%, respectivamente). Da mesma forma, Barani et

al.,⁽¹⁰⁾ ao estudarem 19 amostras pulmonares e 104 amostras extrapulmonares, obtiveram maior positividade com uma técnica molecular direcionada a *IS6110* e TCR4 do que com o método bacilosκόpio (17 resultados semelhantes e 12 resultados divergentes). Vale ressaltar que foi relatado que 50% dos casos de tuberculose são classificados como negativos com base em resultados de baciloscopia.⁽²⁴⁾ Além disso, a baciloscopia não foi realizada em 32,43% dos casos de tuberculose notificados no Brasil em 2010.⁽¹⁾

Quando se compararam os resultados da *nested* PCR e da cultura em amostras pulmonares, constatou-se que 3 das amostras apresentaram resultados positivos na *nested* PCR mas negativos na cultura. É possível que os resultados negativos nas culturas se devam a coinfeção pelo HIV em 2 dos pacientes e transplante de rim em 1 (Tabela 1) ou às características das infecções paucibacilares.^(6,12) Vários fatores podem influenciar o resultado das culturas, tais como o número de organismos presentes no espécime, os métodos de coleta de amostras, tratamentos anteriores e o método de processamento. Além disso, as soluções utilizadas para a digestão/descontaminação das amostras podem danificar as micobactérias.^(4,25)

No presente estudo, os resultados moleculares corroboraram os critérios clínicos e diagnósticos amplamente aceitos para o diagnóstico da tuberculose. A sensibilidade e a especificidade encontradas para a *nested* PCR em nosso estudo (100% e 83%, respectivamente) são maiores do que as relatadas em estudos anteriores utilizando técnicas moleculares direcionadas ao gene *IS6110* em amostras de escarro (88-98% e 15-100%, respectivamente).^(5,12,23) É possível que essa diferença seja decorrente do volume e tipo de amostras, bem como dos diferentes protocolos de tipagem molecular empregados nos diferentes laboratórios.^(11,26,27) Por isso, a correlação dos resultados com o perfil clínico do paciente é essencial para o diagnóstico da tuberculose, e a definição da doença pode, portanto, ser estabelecida a partir de culturas negativas após o teste terapêutico.⁽²⁶⁾ Isso ocorreu em 3 de nossos pacientes com resultados positivos na *nested* PCR e negativos na cultura em amostras pulmonares, 2 dos quais foram curados após o tratamento e 1 dos quais abandonou o tratamento. Além disso, 2 pacientes faleceram antes do início do tratamento recomendado da tuberculose. Quanto à

concordância entre *nested* PCR e cultura, embora o coeficiente kappa (0,50) tenha sido menor do que o relatado em outros estudos, realizados na Índia (kappa = 0,6-0,8) e no Brasil (kappa = 0,78), ela foi boa.

Com relação às amostras extrapulmonares, a *nested* PCR foi positiva em 3 das amostras de sangue com resultados negativos na cultura e negativa em 1 das amostras de líquido cefalorraquidiano com resultado positivo na cultura. É possível que esse resultado falso-negativo em uma amostra de líquido cefalorraquidiano (Tabela 1) esteja relacionado à ausência de cópias do gene *IS6110*, como descrito anteriormente em estudos realizados no sudeste da Ásia, Dinamarca, Tunísia, Índia e Vietnã, indicando a necessidade de incorporação de alvos adicionais, tais como TRC4, para que se melhore a detecção molecular.^(7,10) Porém, até onde sabemos, nenhum estudo até hoje relatou a ausência desse elemento nas cepas de *M. tuberculosis* no Brasil, e vários estudos relataram que essa sequência é a mais sensível para a detecção do complexo *M. tuberculosis*.^(9,17) Outro fator poderia ser a presença de inibidores para as reações moleculares em até 18,6% dos espécimes extrapulmonares.⁽⁵⁾

No Brasil, a prevalência de *M. tuberculosis* isolados em cultura varia de 15,0% a 25,6%,^(28,29) sendo que os maiores valores foram obtidos antes da era da terapia antirretroviral altamente ativa. Resultados positivos na *nested* PCR em amostras de sangue levou ao diagnóstico de tuberculose pulmonar em 2 pacientes HIV negativos e em 1 paciente HIV positivo, bem como ao diagnóstico de tuberculose extrapulmonar em 1 paciente HIV negativo e em 1 paciente HIV positivo. Naquelas amostras de sangue, a baciloscopia e a cultura foram positivas em apenas 1 e 2 amostras, respectivamente; é possível que isso se deva ao pequeno número de bacilos na circulação.^(6,7) Na verdade, foi relatado que a sensibilidade da PCR em células mononucleares de sangue periférico, como aqui utilizada, é melhor do que a da cultura, sendo que ambas apresentam especificidade semelhante.^(11,16,29) Além disso, espécimes clínicos, tais como líquido cefalorraquidiano, sangue e escarro, têm sido descritos como bons substratos para PCR⁽²⁶⁾ com boa concordância (kappa = 0,6867; p = 0,625; teste de McNemar), como em nossos resultados, nos quais o nível de positividade nas amostras extrapulmonares foi maior quando a *nested* PCR foi utilizada, corroborando assim

os achados de Noussair et al.⁽²¹⁾ Diferentes taxas de sensibilidade foram descritas utilizando a metodologia molecular para esse tipo de amostra em estudos realizados na França⁽²¹⁾ e Índia⁽¹²⁾ (86,6% e 90%, respectivamente). Se estudos de padronização utilizando o mesmo alvo molecular, método de extração do DNA e otimização da PCR fossem validados em diferentes laboratórios, a sensibilidade do teste poderia ser melhorada e, conseqüentemente, também sua concordância.

No presente estudo, um resultado positivo na *nested* PCR, associado a características clínicas, foi utilizado como único critério laboratorial para o diagnóstico de 4 pacientes (2 com tuberculose pulmonar e 2 com tuberculose extrapulmonar), pois ela foi o único teste que produziu resultados positivos (Tabela 1); é possível que a ausência de isolados na cultura seja principalmente devida ao caráter paucibacilar das amostras. Embora a diferença não seja significativa nessa situação, o diagnóstico é geralmente estabelecido apenas com base em dados clínicos e radiológicos, mesmo que a cultura e o exame de escarro sejam negativos. Em tais casos, a análise molecular pode ajudar a estabelecer a terapia específica com agentes antimicobacterianos e, conseqüentemente, contribuir para a redução do tratamento empírico, que tem sido utilizado atualmente em quase 27% dos casos suspeitos de tuberculose pulmonar. Além disso, ela pode ajudar a controlar a disseminação do bacilo⁽¹¹⁾ e evitar uma evolução clínica mais grave, principalmente em pacientes HIV positivos. Porém, as atuais diretrizes brasileiras para a tuberculose não incluem resultados moleculares positivos na definição dos casos de tuberculose; em regra, o uso desse método tem sido restrito a certos centros de referência e pesquisa no Brasil.⁽⁹⁾

Vale mencionar que a triagem clínica cuidadosamente elaborada para o estudo da doença causada por micobactérias, juntamente com atenção semelhante à coleta e transporte das amostras biológicas, são fatores que contribuíram para o isolamento de uma maior taxa de cepas de *M. tuberculosis* do que era esperado em nosso hospital. O presente estudo corrobora os resultados obtidos em um centro de referência para o diagnóstico da tuberculose na cidade de São José do Rio Preto (XV Divisão Regional de Saúde do Estado de São Paulo), no qual se observou um aumento de 50% no número de isolados durante o período de estudo.⁽²⁵⁾

Os resultados do ensaio de *nested* PCR mostraram boa concordância com aqueles da cultura. A especificidade e a sensibilidade alcançadas com essa abordagem molecular relativamente simples podem ser vistas como uma importante contribuição para o futuro estabelecimento de um protocolo para a detecção molecular do complexo *M. tuberculosis* em amostras pulmonares e extrapulmonares. Além disso, essa metodologia poderia reduzir o tempo necessário para o diagnóstico adequado da tuberculose.

Referências

1. World Health Organization [homepage on the Internet]. Geneva: World Health Organization. [cited 2012 May 10]. Brazil - Tuberculosis profiles. Available from: https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=%2FWHO_HQ_Reports%2FG2%2FPROD%2FEXT%2FTBCountryProfile&ISO2=BR&outtype=html
2. World Health Organization [homepage on the Internet]. Geneva: World Health Organization. [cited 2012 Mar 18]. HIV/AIDS. Available from: <http://www.who.int/hiv/topics/tb/en>
3. REDE-TB - Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose [homepage on the Internet]. Rio de Janeiro: Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose. [cited 2012 Jul 10]. Tuberculose, o 'mal do século' XXI. Available from: <http://redetb.org/noticias/155-noticias-abr2012/1681-tuberculose-o-mal-do-seculo-xxi>
4. Ani A, Okpe S, Akambi M, Ejelionu E, Yakubu B, Owolodun O, et al. Comparison of a DNA based PCR method with conventional methods for the detection of *M. tuberculosis* in Jos, Nigeria. *J Infect Dev Ctries*. 2009;3(6):470-5. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.420> PMID:19762962
5. Cheng VC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24(11):711-20. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-005-0039-1> PMID:16283213
6. da Cruz HL, de Albuquerque Montenegro R, de Araújo Lima JF, da Rocha Poroca D, da Costa Lima JF, Maria Lapa Montenegro L, et al. Evaluation of a nested-PCR for mycobacterium tuberculosis detection in blood and urine samples. *Braz J Microbiol*. 2011;42(1):321-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000100041> PMID:24031638 PMCID:PMC3768939
7. Ereqat S, Bar-Gal GK, Nasereddin A, Said S, Greenblatt CL, Azmi K, et al. Pulmonary tuberculosis in the West Bank, Palestinian Authority: molecular diagnostic approach. *Trop Med Int Health*. 2011;16(3):360-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02697.x> PMID:21159079
8. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet*. 2011;378(9785):57-72. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62173-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62173-3)
9. Conde MB, Melo FA, Marques AM, Cardoso NC, Pinheiro VG, Dalcin Pde T, et al. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. *J Bras Pneumol*. 2009;35(10):1018-48. PMID:19918635
10. Barani R, Sarangan G, Antony T, Periyasamy S, Kindo AJ, Srikanth P. Improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* using two independent PCR targets in a tertiary care centre in South India. *J Infect Dev Ctries*. 2012;6(1):46-52. PMID:22240428
11. Lima JF, Montenegro LM, Montenegro Rde A, 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. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132009000700011> PMID:19669008
12. Sekar B, Selvaraj L, Alexis 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. <http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.43575> PMID:18974489
13. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control; 1985.
14. Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC Microbiol*. 2008;8:48. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-8-48> PMID:18366704 PMCID:PMC2323382
15. Gopinath K, Singh S. Multiplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complexes and other *Mycobacterium* species directly from clinical specimens. *J Appl Microbiol*. 2009;107(2):425-35. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04218.x> PMID:19302308
16. Rebollo MJ, San Juan Garrido R, Folgueira D, Palenque E, Díaz-Pedroche C, Lumbrales C, et al. Blood and urine samples as useful sources for the direct detection of tuberculosis by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;56(2):141-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.03.018> PMID:16698218
17. Ritis K, Tzoanopoulos D, Speletas M, Papadopoulos E, Arvanitidis K, Kartali S, et al. Amplification of IS6110 sequence for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in HIV-negative patients with fever of unknown origin (FUO) and evidence of extrapulmonary disease. *J Intern Med*. 2000;248(5):415-24. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2796.2000.00750.x> PMID:11123506
18. Rossetti ML, Jardim SB, Rodrigues VF, Moura AR, Oliveira H, Zaha A. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *J Microbiol Methods*. 1997;28(2):139-46. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(97\)00978-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(97)00978-0)
19. Negi SS, Anand R, Pasha ST, Gupta S, Basir SF, Khare S, et al. Diagnostic potential of IS6110, 38kDa, 65kDa and 85B sequence-based polymerase chain reaction in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Indian J Med Microbiol*. 2007;25(1):43-9. <http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.31061> PMID:17377352
20. Noussair L, Bert F, Leflon-Guibout V, Gayet N, Nicolas-Chanoine MH. Early diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by a new procedure combining broth culture and PCR. *J Clin Microbiol*. 2009;47(5):1452-7. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00066-09> PMID:19321729 PMCID:PMC2681850
21. Purohit MR, Mustafa T, Wiker HG, Sviland L. Rapid diagnosis of tuberculosis in aspirate, effusions, and cerebrospinal fluid by immunocytochemical detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antigen

- MPT64. *Diagn Cytopathol*. 2012;40(9):782-91. <http://dx.doi.org/10.1002/dc.21637> PMID:21416644
22. Portal Saúde [homepage on the Internet]. Brasília: Ministério da Saúde. [cited 2011 Jun 06]. Informe Técnico de Tuberculose. Novo sistema de tratamento da tuberculose para adultos e adolescentes no Brasil. [Adobe Acrobat document, 8p.]. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_tb_julho10_certo_22_07_2010.pdf
23. Sharma SK, Mohan A. Extrapulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res*. 2004;120(4):316-53. PMID:15520485
24. Haldar S, Chakravorty S, Bhalla M, De Majumdar S, Tyagi JS. Simplified detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum using smear microscopy and PCR with molecular beacons. *J Med Microbiol*. 2007;56(Pt 10):1356-62. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47265-0> PMID:17893174
25. Pedro Hda S, Pereira MI, Goloni Mdo R, Ueki SY, Chimara E. Nontuberculous mycobacteria isolated in São José do Rio Preto, Brazil between 1996 and 2005. *J Bras Pneumol*. 2008;34(11):950-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132008001100010> PMID:19099102
26. Bollela VR, Sato DN, Fonseca BA. Problems in the standardization of the polymerase chain reaction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis [Article in Portuguese]. *Rev Saude Publica*. 1999;33(3):281-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101999000300009> PMID:10457001
27. Runa F, Yasmin M, Hoq MM, Begum J, Rahman AS, Ahsan CR. Molecular versus conventional methods: clinical evaluation of different methods for the diagnosis of tuberculosis in Bangladesh. *J Microbiol Immunol Infect*. 2011;44(2):101-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2010.05.001> PMID:21439511
28. Oplustil CP, Leite OH, Oliveira MS, Sinto SI, Uip DE, Boulos M, et al. Detection of mycobacteria in the bloodstream of patients with acquired immunodeficiency syndrome in a university hospital in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2001;5(5):252-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702001000500003> PMID:11779451
29. Nakatani SM, Burger M, Assef MC, Brockelt SR, Cogo LL, Messias-Reason J. Efficient method for mycobacterial DNA extraction in blood cultures aids rapid PCR identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23(11):851-4. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-004-1236-z> PMID:15558344

Sobre os autores

Adriana Antônia da Cruz Furini

Professora. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto (SP) Brasil.

Heloisa da Silveira Paro Pedro

Pesquisadora Científica. Setor de Micobactérias, Instituto Adolfo Lutz, São José do Rio Preto (SP) Brasil.

Jean Francisco Rodrigues

Estudante de Farmácia. Centro Universitário de Rio Preto, São José do Rio Preto (SP) Brasil.

Lilian Maria Lapa Montenegro

Bióloga. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife (PE) Brasil.

Ricardo Luiz Dantas Machado

Pesquisador em Saúde Pública. Instituto Evandro Chagas, Belém (PA) Brasil.

Célia Franco

Médica. Fundação Faculdade Regional de Medicina, São José do Rio Preto (SP) Brasil.

Haiana Charifker Schindler

Pesquisadora. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife (PE) Brasil.

Ida Maria Foschiani Dias Batista

Pesquisadora. Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru (SP) Brasil.

Andrea Regina Baptista Rossit

Professora. Universidade Federal Fluminense, Niterói (RJ) Brasil.