

DETECÇÃO DE DNA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EM LÂMINAS DE BACILOSCOPIA

GRAZIELE LIMA BELLO¹
LEONARDO SOUZA ESTEVES²
CRISTIANA ALVES MARTINS³
PRISCILA MESQUITA SERAFIM³
FRANCIELI CARNIEL⁴
MÁRCIA SUSANA NUNES SILVA^{4,5}
MARIA LUCIA ROSA ROSSETTI^{4,5}

RESUMO

A tuberculose é uma grave doença infectocontagiosa que infecta uma boa parcela da população mundial, fazendo com que medidas emergenciais de combate e controle da doença sejam tomadas. O presente estudo teve como objetivo detectar o DNA de *Mycobacterium tuberculosis* de amostra clínica fixada em lâmina de baciloscopia. Foram analisadas 113 amostras de DNA extraído diretamente do material fixado na lâmina utilizando fenol/clorofórmio. Os resultados foram comparados com os obtidos na baciloscopia. A sensibilidade encontrada foi 100% e a especificidade foi 97%. Estes resultados indicam a possibilidade do uso desta metodologia como um auxílio no diagnóstico ou ainda um método de obtenção de DNA para estudos moleculares acerca deste agente.

Palavras-chave: Tuberculose, PCR, baciloscopia.

ABSTRACT

Tuberculosis is a serious infectious disease that infect people worldwide annually, causing emergency measures to combat and control the disease are taken. This present study aimed to detect the DNA of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical specimens sputum smear slide. We analyzed 113 DNA samples extracted directly from the material using phenol / chloroform. The results were compared with those obtained in the smear. The sensitivity was 100% and specificity 97%.

¹ Acadêmica do Curso de Biomedicina/ULBRA – Bolsista PROBIC/ FAPERGS

² Pesquisador colaborador CDCT/FEEPS

³ Acadêmica do Curso de Farmácia/ULBRA

⁴ Programa de Pós-Graduação em Genética e Tecnologia Aplicada/ ULBRA

⁵ Professora – orientadora do Curso de Farmácia e Biomedicina/ ULBRA (mrossett@terra.com.br)

These results indicate the possibility of using this detection as a diagnostic aid or a method of obtaining DNA for molecular studies on this agent.

Keywords: Tuberculosis, PCR, sputum smear

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), doença infectocontagiosa que afeta na grande maioria das vezes os pulmões, alcançou no ano de 2010 a marca de 8,8 milhões de novos casos em todo o mundo, sendo que 1,4 milhões destes casos resultaram em morte (WHO, 2012). Até o ano de 2020, caso esse grave quadro não se reverta, teme-se que 1 bilhão de pessoas estejam infectadas, 200 milhões adoeçam e 35 milhões possam vir a óbito (OMS, 2009). No Brasil, no ano de 2010, a incidência de TB foi de 81.946 casos confirmados (WHO, 2012), fazendo com que o país ocupe o 19º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% dos casos estimados para o mundo (BRASIL, 2011).

A TB é causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, conhecida também como bacilo de Koch, ou ainda bacilo ácido-alcool resistente (BAAR), sendo que uma de suas principais características é de infectar pessoas com imunodeficiência, como por exemplo, portadores de AIDS, e/ou ainda que vivam em condições socioeconômicas desfavoráveis (AIT KHALED, 1997). Apesar de haver um tratamento eficiente para TB, que leva a cura na maioria dos casos, o grande problema é o surgimento de cepas resistentes aos fármacos atualmente utilizados no tratamento, tornando assim, de extrema importância, pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos de detecção de resistência aos fármacos e estudos de epidemiologia molecular. Os métodos para o diagnóstico laboratorial da TB que tem sido utilizados rotineiramente são os métodos bacteriológicos, como a baciloscopia e cultura. A cultura apesar das dificuldades para a sua realização é o padrão ouro para o diagnóstico de TB, devido sua alta sensibilidade e especificidade. Porém, devido a característica de crescimento lento do *M. tuberculosis*, necessita de um período de 4 a 8 semanas para que o diagnóstico seja confirmado, o que pode retardar o início do tratamento (BOLLELA, 1999). A baciloscopia é o método mais utilizado, devido a sua rapidez de execução, baixo custo, e simplicidade. Apesar das vantagens inerentes da baciloscopia pelo método de Ziehl Neelsen, algumas desvantagens tornam limitada sua capacidade de diagnóstico, tais como sua sensibilidade, sendo necessária uma quantidade acima de 10.000 bacilos por mL de escarro para que seja possível a visualização em microscópio. No Brasil, no ano de 2010, 19% dos casos novos de TB notificados foram inicialmente diagnosticados como baciloscopia negativa (WHO, 2011).

A especificidade também não é adequada uma vez que a positividade pode resultar perante qualquer espécie do gênero *Mycobacterium* (Van der Zanden *et al.*, 1998).

As técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) apresentam, potencialmente, um alto valor de sensibilidade e especificidade, tanto analítica quanto clínica, sendo capaz de amplificar de maneira exponencial cópias de DNA a partir de uma pequena quantidade de amostra, seja ela proveniente de tecidos biológicos (Michelon *et al.*, 2011), ou ainda de fontes escassas, como materiais fixados em lâminas coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen (Van der Zanden *et al.*, 2003). Diversas técnicas de biologia molecular são empregadas atualmente nos estudos de *M. tuberculosis*, tanto para estudos de epidemiologia molecular, como por exemplo, a técnica de MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit) Spoligotyping (Spacer Oligonucleotide Typing) e RFLP-IS6110 (Restriction Fragment Length Polymorphism) como para estudos de detecções moleculares e verificação do impacto de determinadas mutações no DNA da bactéria relacionado à aquisição de resistência aos fármacos utilizados no tratamento. A hibridização reversa e sequenciamento de DNA são exemplos destas técnicas de biologia molecular.

A obtenção de amostras para realização de estudos moleculares pode tornar-se difícil devido a vários fatores, como dificuldade de transporte de amostra clínica, lento crescimento da bactéria em meio de cultura, entre outros, tornando a utilização de DNA de amostra clínica fixada em lâmina de microscopia uma boa alternativa. Além disso, a utilização da detecção de DNA a partir de lâminas de microscopia pode possibilitar uma confirmação de diagnóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas no estudo 113 amostras de escarro fixadas em lâminas de baciloscopia coradas pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN) oriundas de uma unidade de saúde do município de Ji-Paraná, Rondônia.

Extração de DNA:

O DNA de *M. tuberculosis* foi extraído do escarro fixado nas lâminas de baciloscopia, segundo um

protocolo adaptado de Van der Zanden et al. (2003), da seguinte forma: em uma capela de fluxo laminar foi adicionado 100 μ L de água ultrapura sobre o esfregão da lâmina, para facilitar o desprendimento da amostra; em seguida, foi utilizada uma lâmina limpa para fazer a raspagem do material. Este foi colocado em um tubo de 0,5 mL onde, posteriormente, foi adicionada a solução do reagente Chelex 5%. Após, os tubos foram incubados em um termobloco à 56°C por 30 minutos e depois à 100°C por 10 minutos para lise celular. Os tubos foram centrifugados à 14.000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo.

Para a remoção dos interferentes e melhores resultados, este DNA foi submetido a uma etapa de purificação com 200 μ L da solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (24:24:1), homogenizado e centrifugado à 14.000 rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante foi acrescentado 150 μ L de álcool isopropílico, para precipitação do DNA.

Reação em cadeia da polimerase (PCR):

Passada a etapa de extração de DNA, foi realizada a amplificação deste pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), conforme descrito por Rossetti et al. (2006). As etapas foram as seguintes: desnaturação de DNA realizada a 94 C° durante 2 minutos; anelamento dos primers a 68 C° por 2 minutos; e extensão a 72 C° por 2 minutos.

As concentrações dos reagentes da PCR foram as seguintes: cloreto de magnésio 2mM; tampão 10 mM; dNTPs 0,2 mM; primers 10 pmoles; Taq DNA-polimerase 2,5 U. O volume final de cada reação foi de 50 μ L.

Primers:

A sequência-alvo amplificada foi o elemento de inserção IS6110 de *M. tuberculosis* gerando um produto amplificado de 245 pb. As sequências dos primers estão descritas abaixo:

INS1 5` CGTGAGGGCATGGAGGTGGC 3`

INS2 5` GCGTAGGCGTTCGGTGACAAA 3`

Eletroforese:

Para visualização dos fragmentos amplificados na reação de PCR, foi realizada a técnica de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

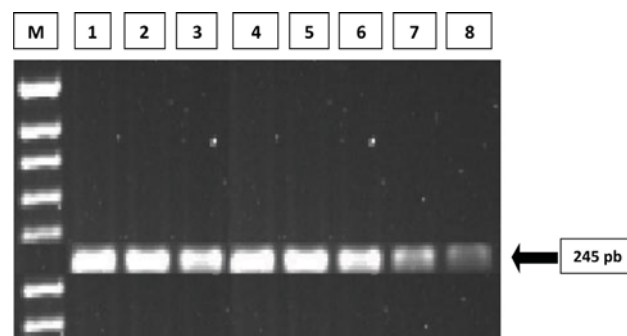
Todas as amostras extraídas foram submetidas aos mesmos protocolos com o uso de controles: controle negativo de extração, controle negativo da reação de PCR, onde uma alíquota da amostra foi substituída por água ultrapura e o controle positivo contendo DNA extraído de uma cepa de referência. O uso destes controles permitiu avaliar as possíveis contaminações durante o processo, além de avaliar a especificidade da técnica.

Padrão de referência: foi utilizada a baciloscopia como padrão de referencia para cálculos de sensibilidade e especificidade, uma vez que a cultura não estava disponível. A baciloscopia é a técnica realizada para o diagnóstico laboratorial de TB na rotina da grande maioria dos serviços de saúde.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

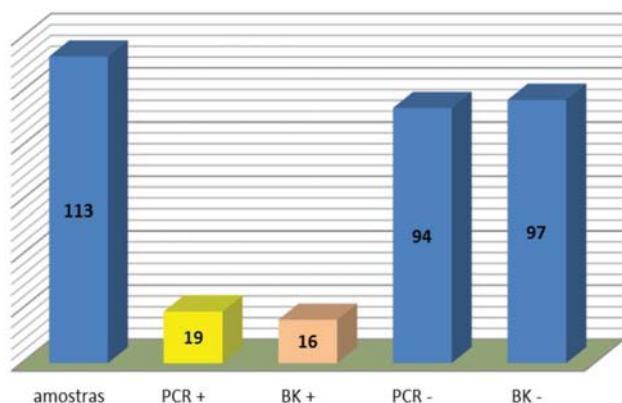
Foram analisadas 113 amostras de baciloscopia; destas, 16 eram consideradas positivas na baciloscopia. Depois da análise pelo método molecular, foi possível identificar corretamente o elemento de inserção após a amplificação em todas as positivas e, também em 3 das negativas. Assim, 19 amostras foram consideradas positivas, segundo observação dos fragmentos de 245 pb (Figura 1).

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. A canaleta com a letra M indica o marcador de peso molecular (*Ladder* 1Kb) 100 pb; as canaletas de número 1 a 8 mostram o produto amplificado de 245 pb indicando as amostras positivas.



As demais amostras que foram negativas na baciloscopia também foram negativas na PCR. A Figura 2 demonstra os resultados obtidos.

Figura 2. Análise comparativa dos resultados obtidos entre o método molecular (PCR) e a baciloscopia.



As três amostras discrepantes, com baciloscopia negativa e PCR positivo, poderiam sugerir resultados “falsos-positivos”, relatados em técnicas de biologia molecular devido à facilidade de contaminação, conforme descrito por Verlengia et al. (2000). No entanto, estas amostras são provenientes de pacientes com forte suspeita de TB segundo os dados clínicos fornecidos pela unidade de saúde.

A sensibilidade e a especificidade da PCR para detectar TB utilizando a pesquisa de DNA em lâminas de baciloscopia foram de 100% e 97% respectivamente, considerando aqui a baciloscopia como padrão que, de certa forma, foi um fator limitante para o estudo, visto que segundo Bollela et al. (1999) a análise de sensibilidade e especificidade nos padrões clássicos da epidemiologia é feita usando a cultura do agente etiológico como padrão de referência.

Segundo Assis et al. (2007), o procedimento de extração de DNA micobacteriano utilizando etapa de purificação pode acometer ao processo diversas possibilidades de perda do DNA, desde a escolha da porção mais adequada do escarro a ser trabalhada até a perda durante a transferência da fração aquosa após partição em líquidos imiscíveis, centrifugação, lavagens e secagem prolongada. Entretanto, o uso de técnicas que envolvam solventes orgânicos, como neste trabalho, quando feito com todos os cuidados necessários para não haver contaminação e nem perda do material, apresenta excelentes resultados. Neste estudo, a ausência de bandas inespecíficas e de possíveis inibidores, possivelmente se deve ao fato de se ter incluído a etapa de purificação com os solventes orgânicos fenol/clorofórmio, que remove os interferentes, aumentando a sensibilidade da técnica.

Na reação de PCR, a escolha do DNA alvo e definição dos *primers* são fatores determinantes para garantir a acurácia da técnica. Neste trabalho, os *primers* utilizados, que foram originalmente descritos por

Eisenach et al. (1990), para a amplificação da sequência de inserção IS6110 já foram referidos como importantes para melhorar a sensibilidade de um método de detecção de DNA porque se encontram repetidos várias vezes no genoma de *M. tuberculosis*. Segundo Ogusku et al. (2004), *primers* para o IS6110 foram os mais indicados em um estudo realizado, no Estado do Amazonas, para a realização da PCR em amostras clínicas e em cepas de *M. tuberculosis* manipuladas em serviços de saúde que realizam o diagnóstico laboratorial de TB.

Portanto, a técnica de PCR realizada demonstrou alta sensibilidade e especificidade, e poderia tornar-se uma alternativa para um diagnóstico de TB mais eficaz que a baciloscopia e menos laborioso que a cultura.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos em nossos estudos iniciais da extração e detecção de DNA de *M. tuberculosis* diretamente de lâminas de baciloscopia possibilitaram demonstrar que esta técnica foi satisfatória para detectar o DNA de *M. tuberculosis*, apresentando sensibilidade, especificidade e rapidez. A PCR poderia complementar as técnicas de diagnóstico de rotina e também ser utilizada para obtenção de DNA para diversos outros estudos com esta bactéria, suprimindo algumas dificuldades na obtenção de amostras para estudo, armazenamento e transporte.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPERGS, à ULBRA, ao CDCT/FEEPS que deram o apoio financeiro e a estrutura; e a todos os participantes que deram sua contribuição pessoal para que este trabalho se realizasse.

REFERÊNCIAS

- AIT KHALED, N. et al. Epidémiologie de la tuberculose et de larésitanceantituberculeux aux. *Rev Mal Respir*, n.18, p. s8-5s, 1997.
- ASSIS, N. C. S. et al. Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. *J Brás Patol Med Lab*, v. 43, n. 1, p. 1-7, fev. 2007.
- BOLLELA, V. R.; SATO, D. N.; FONSECA, B. A. L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 33, n. 3. p. 281-286, 1999.

_____. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

EISENACH, K. D., et al. Polymerase Chain Reaction Amplification of a Repetitive DNA Sequence Specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **J Infect Dis.**, v.161, n.5, p.977-981, 1990.

MICHELON, C. T.; ROSSO; F.; SCHIMID, K. B. et al. Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 106(2):194-199, 2011.

OGUSKU, M. M.; SALEM, J. I. Análise de diferentes primers utilizados na PCR visando ao diagnóstico da tuberculose no Estado do Amazonas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 4, p. 433-439, jul./ago. 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Estatísticas da Tuberculose**. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/research/en/>> Acesso em: 20 jul. 2012.

ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. **Doenças infecciosas; Diagnóstico molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006.

VAN DER ZANDEN, A. G. et al. Use of DNA extracts from Ziel-Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. **Jornal of clinical Microbiology**, p.1101-1108, 2003.

VERLENGIA, R., HIRATA, RD; HIRATA, M. H. **Prevenção e controle da contaminação nas reações de amplificação de ácidos nucleicos**. Newslab, São Paulo. 43, p.69-80. 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2011. **TB indicators**. Disponível em: <<http://apps.who.int/ghodata/?vid=500>> Acesso em: 14 jul. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2012. Tuberculosis Profile. Disponível em: <<http://www.who.int/tb/country/en/index.html>> Acesso em: 19 jul. 2012.