

Detecção de DNA de Mycobacterium tuberculosis em amostras de sangue total utilizando o sistema FTA® card

CARLA ROSSANA DOS SANTOS¹
SUELEN ANGELI¹
CANDICE MICHELON²
KAREN SCHMID²
MARCIA SUSANA NUNES SILVA^{2,3}
MARIA LUCIA ROSA ROSSETTI^{2,4}

RESUMO

A tuberculose (TB) acomete principalmente o pulmão, sendo o escarro a amostra de escolha para o diagnóstico. Porém o mesmo é muitas vezes de difícil obtenção, além de ser muito infecto-contagioso e possuir necessidade de transporte e armazenamento adequados. Além disso, o diagnóstico é baseado na baciloscopia, do qual apresenta pouca sensibilidade e na cultura que é muito demorada. Sendo assim, o presente trabalho visou analisar a possibilidade de realizar o diagnóstico de TB através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com sangue total fixado em FTA® card. Foram fixadas no cartão 20 amostras de sangue, sendo 10 de pacientes com TB (5 HIV positivos e 5 HIV negativos) e 10 de pacientes sem a TB. Dos pacientes com TB, apenas uma amostra não apresentou positividade e nas amostras analisadas de pacientes sem TB, todas foram negativas para o teste realizado.

Palavras-chave: Tuberculose, PCR, Mycobacterium tuberculosis, FTA® card, DNA.

¹ Biomédica formada pela ULBRA

² Pesquisadora do CDCT/FEPPS

³ Professora do Curso de Farmácia/ULBRA

⁴ Professora-orientadora do Curso de Farmácia e Biomedicina/ULBRA e PPG Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA (mrossett@terra.com.br)

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) affects mainly the lungs, and the sputum is the sample of choice for diagnosis. However, this sample is often difficult to obtain and contagious for transportation and storage. Besides, the diagnosis is based on microscopy, which presents low sensitivity, and the culture is time-consuming. The aim of this study was to perform the TB diagnosis, using PCR, with total blood fixed on FTA® card. Twenty blood samples were used. Ten samples were from TB positive patients (5 positive and 5 negative for HIV) and 10 from TB negative patients. Among the patients with TB, only one sample showed no positivity and samples from patients without TB, all were negative for the test performed.

Keywords: Tuberculosis, PCR, *Mycobacterium tuberculosis*, FTA® card, DNA.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é a doença crônica de maior morbidade e mortalidade e continua sendo um sério problema de saúde pública, apesar da disponibilidade de tratamentos eficazes. Brasil e Peru juntos são responsáveis por 50% de todos os casos de TB nas Américas, sendo que no Brasil, a incidência da doença é de 44 casos por 100.000 habitantes (WHO, 2008). Normalmente a TB é adquirida por inalação do bacilo, que se aloja no pulmão, podendo disseminar-se para outros órgãos. O bacilo é expelido pelo paciente com TB ativa (fonte de infecção). Devido a isso o contato com pessoas doentes em ambientes fechados pode provocar a disseminação da doença (ROSSETTI et al., 2006). A TB manifesta-se clinicamente como uma doença crônica ou subaguda, a qual afeta o pulmão em aproximadamente 85% dos casos, também podendo manifestar-se em qualquer outro órgão (TB extrapulmonar). Em pacientes infectados pelo HIV o número de casos de TB extrapulmonar pode chegar a 40%. O risco anual de pessoas co-infectadas com TB e HIV desenvolver TB pode exceder a 10% (CORBET et al., 2003).

Os sintomas da TB consistem em febre, tosse seca e contínua, perda ponderal, sudorese noturna, cansaço excessivo. Nos casos de TB extrapulmonar, os sinais e sintomas dependerão do órgão afetado. As localizações mais freqüentes são pleuras, linfonodos, sistema nervoso central, rins e ossos (BATES, 1980).

No Brasil, o principal agente causal da TB é o *Mycobacterium tuberculosis*, sendo raras as doenças causadas por outras micobactérias, ao contrário dos países desenvolvidos, onde complicações pulmonares são mais frequentes em decorrência de infecções com essas micobactérias (ROSSETTI et al., 2006). *M. tuberculosis* pertence à ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e é um dos componentes do complexo *M. tuberculosis*, juntamente com o *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii* que são identificados com base em características fisiológicas, bioquímicas e de crescimento (ARANAZ et al., 1999; CATALDI; ROMANO, 2007). Os bacilos são resistentes a agentes químicos, mas sensíveis a agentes físicos como radiação ultravioleta e calor.

As micobactérias são um grupo de bacilos que resistem à descoloração por álcool-ácido, por possuírem uma parede celular constituída por ácidos micólicos, que conferem resistência à descoloração. São microorganismos de crescimento lento, devido a uma constituição hidrofóbica da parede celular, o que dificulta a entrada de nutrientes nas células (OPLUSTIL et al., 2004).

O diagnóstico da TB, ainda é realizado, na maioria das vezes pela baciloscopia, que consiste na pesquisa do bacilo em esfregaços corados pelo método de *Ziehl Neelsen*. Este método apesar de prático é pouco sensível e específico. A cultura do bacilo também é utilizada, mas apesar de mais sensível, demora até 2 meses para a obtenção de um crescimento. Além disso, são poucos os locais que a realizam, uma vez que o método é laborioso e requer cuidados especiais com a biossegurança (BRASIL, 2008). Devido ao seu poder infecto-contagioso, *M. tuberculosis* é considerado um microorganismo de classe de risco 3 (NB3) e requer nível de biossegurança 4 (NB4) para a sua manipulação (LEVY et al., 2004).

Na década de 1990 vários métodos moleculares foram desenvolvidos para detecção direta e identificação do complexo *M. tuberculosis* em diversas amostras clínicas. Esses métodos têm a vantagem de diminuir o tempo na obtenção dos resultados, tornando-os mais precisos para o diagnóstico (OPLUSTIL et al., 2004).

A amostra utilizada para o diagnóstico de TB pulmonar é geralmente o escarro, porém o mesmo apresenta um alto poder infecto-contagioso e não pode ser obtido de alguns pacientes. Nos casos de tuberculose extrapulmonar, o material clínico pesquisado é outro, e muitas vezes são obtidas de forma invasiva como no caso de meningite tuberculosa. Por esses motivos, pesquisas com a utilização de amostras com mais facilidade na sua obtenção,

tais como o sangue e urina são importantes para o diagnóstico. Sendo assim, a detecção do DNA de *M. tuberculosis* em amostras de sangue periférico pode ser uma alternativa para o diagnóstico da TB (TACI et al., 2003, REBOLLO et al., 2006).

Para manter a acurácia dos testes e a segurança técnica no diagnóstico, as amostras utilizadas necessitam de transporte, armazenamento e manuseio adequados e rigorosos. A utilização de cartões comerciais para a conservação e transporte de amostras de vários organismos vem sendo utilizadas com essa finalidade. (OWOR et al., 2007, TACK et al., 2007, GRIMES et al., 2008, TORTOLI et al., 2008, WOLFGRAMM et al., 2009). Os cartões *FTA® Classic Cards* possuem em suas fibras componentes químicos capazes de eliminar o poder infecto-contagioso dos microorganismos por romperem as membranas celulares. O processo de extração de DNA da amostra fixada no cartão é realizado utilizando reagentes que purificam o DNA retido nas suas fibras (WHATMAN, 2002). Além disso, as amostras podem ser estocadas a temperatura ambiente.

Devido aos problemas apresentados, como a inespecificidade e pouca sensibilidade do diagnóstico tradicional, o alto poder infecto-contagioso da amostra, bem como os cuidados excessivos requeridos no transporte, armazenamento e manipulação da mesma, o presente trabalho teve como objetivo verificar a possibilidade de obtenção de DNA de *M. tuberculosis* a partir de sangue total fixado em *FTA® cards* através da técnica de PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas no estudo 20 amostras de sangue total oriundas de um banco de amostras do

Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS). Destas, 10 de pacientes sem TB, do qual foi usado como grupo controle, e 10 de pacientes com diagnóstico de TB através da baciloscopia e/ou cultura de *M. tuberculosis*. Todos os pacientes considerados positivos pelo diagnóstico tradicional, também apresentaram resultado positivo pela técnica de PCR com DNA extraído de escarro. Destas amostras dos pacientes com TB, 5 estavam co-infectados com HIV e 5 apenas com TB. As amostras de pacientes sem TB mostraram resultado negativo nos testes realizados.

As amostras depois de descongeladas em temperatura ambiente foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos com a finalidade de concentrar a amostra. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido com 30 μ L de TE 1x (10mMTris/1mM EDTA, pH 8,0). Após, o material foi dotado no cartão FTA® Classic Card, bem como um controle negativo de extração (TE1x), um controle positivo de extração utilizando a diluição de número 3 da escala de Mac Farland de uma cultura da linhagem H37RV de *M. tuberculosis* e um DNA purificado de *M. tuberculosis* como controle de reação de PCR. Este cartão ficou secando dentro de uma capela por um período de 24h. Após a secagem dos cartões foi dispensado o uso da capela, pois a estrutura química do cartão propicia a quebra da parede celular dos microorganismos, eliminando o seu potencial infecto-contagioso. Foi então realizada a extração de DNA segundo instruções do fabricante do cartão, a fim de eliminar impurezas e DNases, ficando apenas com o DNA retido nas fibras do cartão (WHATMAN, 2002).

Após a extração as amostras foram submetida à reação de PCR. Os primers utilizados foram INS-1 (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC) e INS-2

(5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA), derivados da seqüência de inserção IS6110 (HERMANS et al. 1990) gerando um fragmento de 245 pb.

A enzima utilizada na reação foi a Platinum® Taq DNA polimerase. Foram adicionados à reação de PCR dois discos do cartão com 0,2 μ m contendo as amostras e os respectivos controles. Foram utilizados quatro controles, um negativo de extração, um negativo de reação, um positivo de extração e um positivo de reação, a fim de controlar a existência de contaminação ou de inibição na técnica e a provável etapa em que ocorreram. As concentrações de reagentes e condições de amplificação foram os mesmos utilizados por Rossetti et al (1997).

Os produtos obtidos após reação de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram o fragmento de DNA de 245 pb, correspondente à obtida nos controles positivos de extração e de reação. Considerou-se resultado negativo a ausência de visualização do fragmento nas amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os procedimentos executados para avaliar a possibilidade de obter DNA a partir de amostras de sangue total de pacientes fixados em cartão foram realizados também com os controles. Os resultados obtidos após a PCR, permitiram visualizar fragmentos de DNA correspondentes a 245 pb, conforme esperado e observado em ambos os controles positivos utilizados (extração e reação). Os controles negativos (extração e reação) mostraram-se livres de DNA de *M. tuberculosis*,

uma vez que não apresentaram o fragmento de 245 pb. Dentre as reações de PCR realizadas com as amostras dos 10 pacientes sem TB, nenhuma apresentou resultado positivo, evidenciado pela não visualização do fragmento de 245 pb. Já no caso dos 10 pacientes com diagnóstico de TB foi possível a visualização do fragmento de 245 pb em todos os pacientes co-infectados por TB e HIV e, dentre os pacientes sem co-infecção, apenas um não apresentou tal fragmento.

A detecção do DNA de *M. tuberculosis* fixado em cartões comerciais já havia sido descrita com sucesso anteriormente, porém a mesma havia sido realizada diretamente de DNAs obtidos de culturas (TORTOLLI *et al.*, 2008) e não de amostras clínicas, como realizado no presente trabalho. Os resultados obtidos apesar de preliminares foram bastante satisfatórios, uma vez que somente as amostras de pacientes com TB foram positivas pela técnica proposta. Apenas uma amostra de paciente com TB não foi positiva. Resultados semelhantes foram relatados por Rodrigues e colaboradores (2002), onde os autores mostraram uma sensibilidade de 95% na amplificação de DNA extraído de sangue total de pacientes com HIV. No nosso estudo, todos os pacientes com diagnóstico de TB tinham também uma amostra de escarro positiva no diagnóstico por PCR e, apesar do número amostral ser pequeno para uma comparação, já era esperado que os resultados de PCR com amostras de sangue não possuíssem a mesma eficiência que os realizados com escarro. Vários autores relataram esse fato utilizando PCR com diferentes técnicas de extração e concluíram que, embora a detecção de DNA de *M. tuberculosis* em amostras de sangue total apresenta-se como uma alternativa à utilização do escarro, a sensibilidade é inferior (ROLFS *et al.*, 1995, CONDOS *et al.*, 1996, AHMED *et al.*, 1998, TACI *et al.*, 2003, REBOLLO *et al.*, 2006).

Isso pode acontecer por vários motivos entre eles a inibição da reação de PCR pela hemoglobina ou quantidade insuficiente de DNA presente no sangue para servir como alvo na reação de amplificação (SPERHACKE *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram serem bastante específicos, pelo fato de não terem ocorrido resultados falso positivos e todos os pacientes sem TB apresentarem resultados negativos.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nestes testes iniciais com o protocolo padronizado utilizando o sangue total de pacientes fixado no FTA® *Classic Card* para a detecção por PCR de DNA de *M. tuberculosis*, é possível inferir que, apesar do número de amostras ser baixo, a técnica apresentou resultados satisfatórios quanto à extração de DNA e rapidez para a detecção do *M. tuberculosis*. Também, é provável que mesmo que a amplificação de DNA por PCR a partir de sangue não seja tão eficiente quanto à de outras amostras, ainda assim, pode ser importante como exame complementar em casos quando a amostra não é escarro, como no caso de TB extrapulmonar. Para uma análise quanto a acurácia na utilização de sangue como amostra para o diagnóstico de TB e a possível influência da imunodepressão na detecção da doença, será necessário que um número maior de amostras seja analisado e comparado com o diagnóstico tradicional.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq, a ULBRA Canoas, ao CDCT/FEPPS, que forneceram toda a estrutura

e fomento necessários para o desenvolvimento deste trabalho e à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da ULBRA por possibilitar a divulgação de nosso trabalho.

REFERÊNCIAS

AHMED, N. *et al.* PCR- Based Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Blood from Immunocompetent Patients with Pulmonary Tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 3094–3095, 1998.

ARANAZ, A. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. **Int J Syst Bacteriol.**, v. 3, p.1263-1273, 1999.

BRASIL. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Microbactérias.** Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BATES, J. H. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. **Clinical Chest Medicine**, v. 1, n. 2, p, 167-174, 1980.

CATALDI, A.; ROMANO, I. Tuberculosis caused by Other Members of the *M. tuberculosis* Complex. In: Palomino JC; Leão SC, Ritacco V. **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care.** 2007. [S.l.]: Amedeo Challenge, 2007. cap. 8, p. 283-314. Disponível em: <<http://www.TuberculosisTextbook.com>> Acesso em: 15 jul. 2010.

CONDOS, R. *et al.* Peripheral – blood – based PCR Assay to Identify Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. **The Lancet.**, v. 347, p. 1082–1085, 1996.

CORBET, E. L. *et al.* The Growing Burden of Tuberculosis: Global Trends and Interactions with the HIV Epidemic. **Archives of International Medicine**, v. 163, p. 1009–1021, 2003.

GRIMES, K. A. *et al.* PCR – Based Assay Using Occult Blood Detections Cards for Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* in Specimens from U.S. Travelers to Mexico with Acute Diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2227–2230, 2008.

HERMANS, P. W. *et al.* Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strain by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 12004-1213, 1990.

LEVY, C. E. *et al.* **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde.** Módulo II. Salvador: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

OPLUSTIL, C. P. *et al.* **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica.** São Paulo: Sarver, 2004.

OWOR, B. E. *et al.* Successful Application of FTA® Classic Card Technology and Use of Bacteriophage ϕ 29 DNA Polymerase for Large –scale Field Sampling and Cloning of Complete Maize Streak Virus Genomes. **Journal of Virological Methods**, v. 140, p. 100–105, 2007.

REBOLLO, M. J. *et al.* Blood and Urine Samples as Useful Sources for the Direct Detection of Tuberculosis by Polymerase Chain Reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 56, n. 2, p. 141-146, out. 2006.

RODRIGUES, V. F. *et al.* Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. **Antimicrob**

Agents Chemother, v. 49, n. 1, p. 444-446, 2005

RODRIGUES, V. F. et al. Erratum: Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 11, p. 3970, nov. 2006.

ROLFS, A. et al. Amplification of *Mycobacterium tuberculosis* from Peripheral Blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 3312-3314, 1995.

ROSSETTI, M. L. R. et al. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* Detection in Clinical Samples Using DNA Purified by Glass Matrix. **Journal of Microbiology Methods**, v. 28, p. 139-146, 1997.

ROSSETTI, M. L. R. et al. (Orgs.) **Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SPERHACKE, R.D. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. **International Journal Tuberculosis Lung Disease**, v. 8, n. 3, p. 312-317, 2004.

TACI, N. et al. Detection of *Mycobacterium*

tuberculosis DNA from Peripheral Blood in Patients with HIV –seronegative and New Cases of Smear –positive Pulmonary Tuberculosis by Polymerase Chain Reaction. **Respiratory Medicine**, v. 97, p. 676-681, 2003.

TACK, L. C. et al. Automated Forensic DNA Purification Optimized for FTA® Cards Punches and Identifiler STR –based PCR Analysis. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 27, p. 183-191, 2007.

TORTOLI, E. et al. Use of Commercial Cards for Freeing DNA from Micobacterial Strains. **New Microbiologica**, v. 31, p. 151-53, 2008.

WHATMAN. **FTA Protocol: Collect, Transport and Access Nucleic Acids – All at Room Temperature: WB120047**. [S.l.]: Whatman, 2002.

WOLFGRAMM, E. V. et al. Simplified Buccal DNA Extraction with FTA® Elute Cards. **Forensic Science International: Genetics**, v. 3, p. 125-127, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing. **WHO Report**. 2008. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/pdf/annex3_amr.pdf. Acesso em: 15 jul. 2010.