



AVALIAÇÃO DA STNPCR COLORIMÉTRICA EM AMOSTRAS DE SANGUE DE PACIENTES COM TUBERCULOSE – RESULTADOS PRELIMINARES

Marcela Pereira Salazar; Luanna de Ângelis Correia de Sousa; Fabiana Cristina Fulco Santos; Haiana Charifker Schindler

Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE; marcelapsalazar@hotmail.com

Resumo

A tuberculose (TB) é uma das doenças infecciosas com maiores taxas de morbimortalidade no mundo. Seu diagnóstico convencional é difícil e possui limitações, sobretudo nas formas paucibacilares. A reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo utilizada como auxiliar no diagnóstico da TB, por ser mais rápida, ter alta sensibilidade e especificidade. A Nested PCR em único tubo (STNPCR) é ainda mais sensível, oferece menor risco de contaminação cruzada e permite a identificação do *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) diretamente de amostras clínicas. A STNPCR colorimétrica oferece um sistema molecular rápido, de fácil execução e interpretação. O objetivo deste trabalho foi definir os parâmetros laboratoriais da STNPCR colorimétrica automatizada a partir de amostras de sangue (plasma e PBMC) de pacientes com TB. Foram 4,5ml de sangue por punção venosa em tubos com EDTA. O DNA foi extraído e submetido à STNPCR, que teve como alvo a sequência de inserção IS6110. Foram usados dois pares de *primers*: TJ3 e TJ5; OLI 5 e STAN 3. O OLI 5 teve adicionado em sua porção 5' uma biotina. Para a reação colorimétrica, utilizou-se uma sonda específica. Os resultados mostraram um limite de detecção do DNA de 10pg/μL. O valor do *cut off* foi 0,110 em plasma (S=55,5 e E= 80%), e 0,090 em PBMC (S=72,3% e E=54,3%). A concordância, medida pelo valor do índice kappa, entre a detecção colorimétrica e o gel de agarose foi considerada leve. Conclui-se que, embora a sensibilidade e especificidade tenham tido grande variação, a técnica pode ser eficaz para auxiliar o diagnóstico da TB. Um número maior de amostras é necessário para a obtenção de resultados melhores.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença crônica, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), que afeta o homem desde a pré-história, e permanece como uma das principais doenças infecciosas do mundo, com altas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente nos países em desenvolvimento (COMAS et al., 2014). As técnicas laboratoriais convencionais utilizadas para o diagnóstico da TB (baciloscopia e cultura) apresentam sensibilidade variada. A baciloscopia, quando executada corretamente, permite detectar de 70 a 80% dos casos de TB pulmonar (TBP) em



uma comunidade. Entretanto, tem uma baixa sensibilidade para diagnosticar casos paucibacilares, aqueles casos cujas amostras têm poucos bacilos, com seus valores variando de 0 a 40%. Na cultura, método considerado padrão ouro, a sensibilidade varia de 0 a 80%. Além disso, o *Mtb* tem crescimento lento, podendo requerer até 60 dias para a obtenção de um resultado definitivo, o que compromete o tratamento do paciente (BRASIL, 2009a; BENTO et al., 2011; LAWN; ZUMLA, 2012; MEHTA et al., 2012).

A PCR é uma técnica molecular que detecta sequências nucleotídicas diretamente de amostras clínicas, podendo dar um resultado em poucas horas (MEHTA et al., 2012; FURINI et al., 2013; LUO; BANAEI, 2013). A Nested PCR (NPCR) é uma variação da PCR convencional e oferece maior sensibilidade e especificidade, pois associa duas reações de PCR, em que uma segue a outra. A Nested PCR em único tubo (STNPCR) tem a vantagem de ter menor risco de contaminação cruzada (ABATH et al., 2002; LIMA et al., 2015).

Com a dificuldade de se obter amostras biológicas, especialmente nos casos de TB extrapulmonar (TBEP), e mesmo em suspeita de TBP, muitas pesquisas moleculares vêm sendo realizadas em amostras de sangue e urina como uma alternativa para o diagnóstico da TB (DUBEY et al., 2013; HAJIABDOLBAGHI et al., 2014; HEYDARI et al., 2014; LIMA et al., 2015; MARANGU et al., 2015). Nos casos de TBEP, a confirmação do diagnóstico se torna ainda mais difícil. A doença é tipicamente paucibacilar, os sintomas são inespecíficos e dependem do órgão afetado. As amostras clínicas normalmente se localizam em sítios do corpo que são de difícil acesso, necessitando de procedimentos invasivos para sua coleta (MEHTA et al., 2012; MAYNARD-SMITH et al., 2014; VITTOR et al., 2014).

A detecção colorimétrica se baseia na técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunofluorescent Assay*) para a detecção do produto amplificado pela PCR. Uma sonda específica, complementar ao *amplicon* gerado pela PCR, é previamente fixada na placa, onde o DNA amplificado é colocado posteriormente. A revelação acontece depois da adição de um substrato específico, que reage com a enzima e forma uma coloração, lida em leitor de ELISA através da densidade ótica (ROSSETTI et al., 2006; CARDOSO, 2013; SUE et al., 2014). Este trabalho teve como objetivo, definir os parâmetros da STNPCR colorimétrica automatizada em amostras de sangue de pacientes com TB. A automatização desta técnica, com uso de lavadora e incubadora automática de microplacas, junto à STNPCR, oferece um sistema de diagnóstico mais rápido e preciso.



Metodologia

Foram selecionadas amostras de sangue de pacientes com TB pulmonar ou extrapulmonar, de ambos os sexos e faixa etária variada, provenientes de hospitais da rede SUS. Para os controles negativos foram selecionados pacientes que inicialmente entraram como casos suspeitos de TB, mas que tiveram o diagnóstico final “não TB”. Os pacientes foram classificados da seguinte maneira:

a) Pacientes com TB Pacientes com evidência clínica e/ou epidemiológica de TB, e isolamento do *Mtb* em amostra clínica através de exame direto ou cultura, ou exame histopatológico, ou resposta ao tratamento específico.

b) Pacientes sem TB: Pacientes sem TB, com quadro clínico e laboratorial não compatível com a doença e diagnóstico molecular por PCR negativo.

Foram coletados 4,5 ml de sangue por punção venosa usando tubos com EDTA. Após a coleta, o sangue foi processado através da separação dos elementos do sangue (plasma, PBMC e hemácias) com Ficoll, e utilizamos plasma e PBMC para o processo de extração de DNA.

O DNA foi submetido à STNPCR, que teve como alvo a sequência de inserção IS6110. Foram usados dois pares de *primers*: TJ3 e TJ5; OLI 5 e STAN 3. O OLI 5 teve adicionado em sua porção 5' uma biotina. Para a reação colorimétrica, utilizou-se uma sonda específica. A técnica foi realizada em lavadora automática e leitor de ELISA.

Todos os pacientes foram esclarecidos sobre a pesquisa e convidados a participar como membro voluntário, assinando um termo de livre consentimento referente à sua participação na pesquisa.

Resultados

Foram analisadas 98 amostras de plasma e 100 amostras de PBMC. Para análise do limite de detecção da técnica, foi feita um curva de diluição de DNA da cepa de referência H37RV em amostras de sangue (plasma e PBMC), de pacientes sabidamente negativos (sem TB). Após análise da absorbância, o limite de detecção foi de 10pg/ μ L da amostra, tanto para o plasma como para os PBMC.

As leituras de absorbância da STNPCR colorimétrica automatizada nas amostras de sangue foram avaliadas pela análise da curva ROC. Nas amostras de plasma, o valor da área sob a curva foi de 0,679 (IC= 57,7% - 76,9%). Nos PBMC, a área sob a curva foi de 0,612 (IC= 51,0% - 70,8%). Os valores de sensibilidade e especificidade definidos para as amostras de plasma foi de 55,5% e



80,0%, respectivamente. Nos PBMC, os valores encontrados foram 72,3% de sensibilidade e 54,3% de especificidade.

Calculamos o valor de Kappa a partir do valor do *cut off* determinado pela curva ROC. A partir deste valor, definimos as amostras positivas e negativas e comparamos os resultados encontrados na detecção colorimétrica com os resultados encontrados no gel de agarose. As duas amostras, plasma e PBMC, mostraram leve concordância com o gel de agarose. Os valores do índice Kappa foram 0,026 no plasma e 0,132 nos PBMC. Entretanto, apenas para os PBMC os resultados foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Analisando a amostra de sangue em conjunto (plasma + PBMC), o valor de Kappa encontrado foi 0,126, concordância também considerada leve.

Discussão e conclusões

O desenvolvimento de novas ferramentas moleculares tem grande importância no diagnóstico rápido da TB. A proposta de um sistema molecular baseado na técnica de PCR, com detecção automatizada e objetiva, configura-se como uma ferramenta de diagnóstico rápida e precisa. A utilização da detecção colorimétrica automatizada baseia-se na facilidade de execução da técnica; na interpretação dos resultados, que é feita de maneira objetiva; além da possibilidade de análise de uma grande quantidade de amostras ao mesmo tempo (SUE et al., 2014).

A STNPCR colorimétrica mostrou um ótimo limite de detecção, muito superior ao encontrado nos métodos convencionais de rotina, podendo ser utilizada para o diagnóstico auxiliar da TB, inclusive nos casos paucibacilares. O limite de detecção encontrado no sangue é equivalente a 20 bacilos/ml de amostra (KOX et al., 1994; PORTILLO-GOMEZ et al., 2000; LIMA et al., 2009). Mesmo com um limite de detecção considerado um pouco alto, o sangue parece ser um espécime biológico útil na detecção do *Mtb*, especialmente em casos extrapulmonares, uma vez que os sítios de infecção para a coleta de amostras biológicas são de difícil acesso (MEHTA et al., 2012). Em contrapartida, o sangue é uma amostra clínica de coleta ambulatorial e com poucas restrições para a sua coleta (LIMA et al., 2015).

O plasma, que teve seu *cut off* definido em 0,110 e mostrou um valor área sobre a curva de 0,679, com $p < 0,05$. Um valor acima de 0,5 (valor no qual o teste não oferece capacidade discriminatória) é considerável (LAGO, 2007). O valor da sensibilidade foi definido em 55,5% e especificidade foi de 80,0%. Embora o valor da área sob a curva não tenha sido considerado excelente, o teste foi capaz de distinguir entre amostras verdadeiramente positivas e falso positivas.



Nos PBMC, o valor do *cut off* foi definido em 0,090. O valor da área sob a curva foi 0,612. Estes resultados indicam que o teste teve um poder discriminatório muito baixo, não diferenciando bem os resultados verdadeiros positivos e falso positivos (LAGO, 2007). Uma possível explicação está na natureza das amostras, que são paucibacilares.

Quanto à análise do Kappa, a baixa concordância entre detecção colorimétrica e gel de agarose pode ser explicada pelo valor da sensibilidade da detecção colorimétrica nestas amostras. O valor da sensibilidade, especialmente no plasma (55,5%), pode refletir na análise do índice Kappa, uma vez que a sensibilidade é a capacidade do teste de reconhecer casos verdadeiramente positivos (OLIVEIRA et al., 2010).

Os resultados obtidos refletem a análise da junção de um sistema de PCR, a STNPCR, com um sistema colorimétrico de detecção de DNA, cujo protocolo é inédito. Neste estudo, o sistema foi padronizado e a análise de amostras biológicas começou a ser feita, sendo estes resultados preliminares. É necessário aumentar o número de amostras analisadas para avaliar melhor os valores de sensibilidade, de especificidade e do índice Kappa.

Referências Bibliográficas

ABATH, F. G. C.; MELO, F. L.; WERKHAUSER, R. P.; et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. **BioTechniques**, v. 33, n. 6, p. 1210–2, 1214, 2002.

BENTO, J.; SILVA, A. S.; RODRIGUES, F.; DUARTE, R. Métodos de diagnóstico em Tuberculose. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, n. 1, p. 145–154, 2011.

BRASIL. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Ministério da Saúde, 2009a.

CARDOSO, F. A. **Desenvolvimento e validação de um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana em amostras de sangue periférico**
Desenvolvimento e validação de um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana em amostras, 2013. Centro de Pesquisas René Rachou

COMAS, I.; COSCOLLA, M.; LUO, T.; et al. NIH Public Access. **Nat Genet**, v. 45, n. 10, p. 1176–1182, 2014.

DUBEY, A.; GWAL, R.; AGRAWAL, S. Mycobacterium tuberculosis detection in blood using multiplex nested polymerase chain reaction. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 17, n. 10, p. 1341–1345, 2013.

FURINI, A. A. C.; PEDRO, H. S. P.; RODRIGUES, J. F.; et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex by nested polymerase chain reaction in pulmonary and extrapulmonary specimens. **J Bras Pneumol**, v. 39, n. 6, p. 711–718, 2013.

HAJIABDOLBAGHI, M.; RASOULINEJAD, M.; DAVOUDI, A. R.; ALIKHANI, A.; NAJAFI, N. Application of peripheral blood Mycobacterium tuberculosis PCR for diagnosis of tuberculosis patients. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 2, p. 185–189, 2014.



- HEYDARI, A. A.; DANESH, M. R. M.; GHAZVINI, K. Urine PCR evaluation to diagnose pulmonary tuberculosis. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 7–10, 2014.
- KOX, L. F.; RHIENTHONG, D.; MIRANDA, A M.; et al. A more reliable PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 3, p. 672–678, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8195377>>.
- LAGO, E. M. O. **Avaliação do desempenho diagnóstico do teste ELISA para a cisticercose em inquéritos sorológicos**, 2007. Universidade de São Paulo.
- LAWN, S. D.; NICOL, M. P. Xpert® MTB / RIF assay : development , evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. **Future Microbiol.**, v. 6, n. 9, p. 1067–1082, 2011.
- LIMA, J. F. C.; MONTENEGRO, L. M. L.; MONTENEGRO, R. A.; et al. Performance of nested PCR in the specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex in blood samples of pediatric patients. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 7, p. 690–697, 2009.
- LIMA, J. F. D. C. **Desenvolvimento da Nested PCR em único tubo (STNPCR) com detecção colorimétrica para o diagnóstico de tuberculose**, 2014. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- LIMA, J. F. DA C.; GUEDES, G. DE M. R.; LIMA, J. F. DE A.; et al. Single-tube nested PCR assay with in-house DNA extraction for Mycobacterium tuberculosis detection in blood and urine. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 731–738, 2015.
- LUO, R. F.; BANAEI, N. Molecular approaches and biomarkers for detection of mycobacterium tuberculosis. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 33, n. 3, p. 553–566, 2013. Elsevier Inc.
- MARANGU, D.; DEVINE, B.; JOHN-STEWART, G. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests in urine for pulmonary tuberculosis: A meta-analysis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 19, n. 11, p. 1339–1347, 2015.
- MAYNARD-SMITH, L.; LARKE, N.; PETERS, J. A.; LAWN, S. D. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary and pulmonary tuberculosis when testing non-respiratory samples: a systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 709, 2014.
- MEHTA, P. K.; RAJ, A.; SINGH, N.; KHULLER, G. K. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 20–36, 2012.
- OLIVEIRA, G. M. DE; CAMARGO, F. T.; GONÇALVES, E. C.; DUARTE, C. V. N.; GUIMARÃES, C. A. Systematic review of diagnostic tests accuracy: a narrative review. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 37, n. 2, p. 153–156, 2010.
- PORTILLO-GOMEZ, L.; MORRIS, S. L.; PANDURO, A. Rapid and efficient detection of extrapulmonary Mycobacterium tuberculosis by PCR analysis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 4, n. 4, p. 361–370, 2000. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtld/2000/00000004/00000004/art00014>>.
- ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D. DA; RODRIGUES, J. J. S. Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular. In: Guanabara (Ed.); **Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular**. 1ª ed., p.2–38, 2006.
- SUE, M. J.; YEAP, S. K.; OMAR, A. R.; TAN, S. W. Application of PCR-ELISA in Molecular Diagnosis. **BioMed Research International**, 2014.
- VITTOR, A. Y.; GARLAND, J. M.; GILMAN, R. H. Molecular Diagnosis of TB in the HIV Positive Population. **Annals of Global Health**, v. 80, n. 6, p. 476–485, 2014.