



AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL EM DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS UTILIZADAS PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR

Autor: Fabiana Cristina Fulco Santos¹; Coautor: Luanna de Ângelis Correia de Sousa^{1,2}; Coautor: Marcela Pereira Salazar¹

¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ; ²Faculdade Integrada de Pernambuco/Facipe
fculco@hotmail.com

Introdução

A tuberculose (TB) também conhecida como “peste branca”, recebeu o título de “capitã da morte de todos os homens” pelo escritor John Bunyan na segunda metade do século XVII, quando a doença atingiu as maiores taxas de mortalidade na Europa (DUCATI et al. 2006).

É uma doença infecto-contagiosa, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e permanece como importante problema de Saúde Pública, acometendo milhares de pessoas e gerando preocupação no âmbito mundial (BERTOLLI, 2010).

Um dos grandes trabalhos sobre TB foi realizado em 1882, por Robert Koch, um estimado cientista, que isolou e cultivou o *M. tuberculosis* de tubérculos macerados. Seus experimentos identificaram a bactéria como o agente etiológico da doença, contribuindo assim para o fortalecimento da teoria da transmissibilidade, desenvolvida na época através das pesquisas de Pasteur e outros cientistas (BLOOM; MURRAY, 1992).

O aumento da incidência de TB nos dias de hoje é, portanto, não apenas um problema médico e biológico, mas sim um problema complexo de saúde pública determinada por fatores políticos, sociais, econômicos, culturais e de práticas sanitárias. Em outras palavras, a TB, uma enfermidade milenar, ainda acompanha a humanidade, refletindo o perfil de uma doença social com implicações médicas (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2015).

Os sintomas e sinais classicamente relacionados com a TB, embora importantes em termos de suspeita diagnóstica, são, na forma extrapulmonar, habitualmente



inespecíficos, e conseqüentemente, de difícil análise diagnóstica. Deste modo, os meios complementares utilizados no diagnóstico desempenham um papel primordial na abordagem desta doença (BENTO et al., 2011).

Embora o quadro clínico permaneça a chave para o diagnóstico da TB, o encontro do *M. tuberculosis* através de cultura permanece o exame padrão-ouro para a confirmação diagnóstica (BRASIL, 2015). No entanto, a sensibilidade do diagnóstico convencional está comprometida em pacientes paucibacilares, sendo frequente o resultado negativo (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2010).

Muitas vezes, o diagnóstico da tuberculose extrapulmonar é feito por exclusão de outras enfermidades e com auxílio da prova tuberculínica de mantoux, o que implica alto risco de erro, em razão da prevalência da infecção tuberculosa ser alta em nosso meio e de muitos pacientes serem imunodeprimidos. Atualmente, novas modalidades diagnósticas têm sido utilizadas na tuberculose. Dentre elas, destacam-se os testes moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), que pode ser úteis em certas formas extrapulmonares da doença (BOLLELA; SATO; FONSECA, 1999).

O diagnóstico da TB extrapulmonar possui várias limitações e ainda representa um desafio para o controle da doença. Esta dificuldade tem levado à busca de novos métodos de diagnóstico auxiliares na identificação de bacilos em amostras paucibacilares.

Diante dos desafios na confirmação do diagnóstico utilizando técnicas laboratoriais convencionais, nas formas paucibacilares incluindo a TB extrapulmonar, verifica-se que há uma lacuna, com um percentual considerável de casos que permanecem sem confirmação diagnóstica e bacteriológica. Com isso, espera-se que a PCR em tempo real, possa contribuir para uma maior detecção em diferentes tipos de amostra de casos paucibacilares da doença, sobretudo da forma extrapulmonar, evitando processos invasivos e tratamentos inadequados, atuando assim no controle da doença.

Metodologia

O presente projeto trata-se de um estudo prospectivo de avaliação de um teste de diagnóstico baseado em PCR em tempo real, realizado no Laboratório de Imunoepidemiologia (Departamento de Imunologia) do Centro de Pesquisas Aggeu



Magalhães/FIOCRUZ (CPqAM). A casuística foi composta por indivíduos de ambos os sexos, sem restrição de idade, provenientes de ambulatórios e enfermarias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e Hospital Correia Picanço.

Foram selecionados 57 pacientes (com suspeita de tuberculose extrapulmonar de várias formas clínicas (pleural, cutânea, óssea, ganglionar, miliar e outras), de ambos os sexos, de idades variadas). O diagnóstico clínico, epidemiológico e laboratorial bem como o tratamento específico do paciente com tuberculose foi realizado pelo médico acompanhante de cada serviço público de saúde.

Os indivíduos selecionados para o estudo foram classificados nos seguintes grupos segundo diagnóstico final.

- a) Pacientes com tuberculose extrapulmonar: quadro clínico e/ou exame de imagem compatível com tuberculose ativa e/ou isolamento do *M. tuberculosis* em amostra clínica através de cultura ou exame histopatológico, ou melhora clínica evidente após tratamento específico;
- b) Pacientes sem TB: pacientes com suspeita inicial de TB extrapulmonar por apresentarem quadro clínico sugestivo ou terem contato com doente bacilífero de TB, e cujo diagnóstico foi afastado pelo médico do serviço através do acompanhamento clínico, exames bacteriológicos negativos.

Resultados e discussão

Dos 57 pacientes com suspeita de tuberculose extrapulmonar selecionados para o estudo, 32 (57,7%) foram do sexo masculino e 23 (42,3%) do feminino, com idade variando de 1 a 89 anos e média de 34 anos. Quanto à procedência hospitalar, 31 (54,4%) foram provenientes do ambulatório e 26 (45,6%) da enfermaria. Dos 38 casos de tuberculose extrapulmonar, confirmados pelo médico acompanhante do serviço de saúde, as principais formas encontradas foram: TB pleural (13), TB óssea (8), TB ganglionar (5), TB cutânea (2), TB meningocefálica (2), TB intestinal (2), TB hepática (1), TB miliar (1) e outros (4). Foram coletados 143 espécimes biológicos dos 57 pacientes suspeitos da doença, sendo 49 amostras de sangue, 46



urinas, 27 biópsias e 21 de outros líquidos. Do total de amostras analisadas, exceto as amostras de sangue, 75% foram negativas através do exame de cultura.

No total de 57 pacientes suspeitos de TB extrapulmonar, 49,1% apresentaram positividade na qPCR, quando se considerou a positividade em qualquer tipo de amostra coletada. A sensibilidade e especificidade foram de 73,7% (IC=57,7 a 84,9) e 84,2% (IC=67,8 a 100,6) respectivamente, considerando como padrão-ouro o diagnóstico clínico e a resposta terapêutica. O índice de Kappa foi de 0,53 ($p < 0,001$).

O desempenho da técnica de qPCR foi avaliado considerando apenas a cultura, como padrão-ouro, obtendo uma sensibilidade de 64,3% (IC=39,2 a 89,4) e especificidade 51% (IC=36,2 a 66,1), respectivamente. O índice de Kappa foi de 0,11 ($p < 0,001$). Considerando isoladamente o diagnóstico clínico e resposta terapêutica como padrão-ouro, o teste molecular apresentou uma especificidade de 73% (IC=58,7 a 87,7) e 85% (IC=75,7 a 103,3), respectivamente. Com índice de kappa de 0,57 ($p < 0,001$).

Neste estudo se avaliou em conjunto vários tipos de amostras clínicas devido ao reduzido número de pacientes. Rosso et al. (2011) avaliando amostras de líquido pleural através de qPCR, encontraram uma sensibilidade melhor (40%), provavelmente pelo maior número de pacientes estudados e por serem portadores de TB pleural, favorecendo o isolamento do bacilo na amostra. Outros trabalhos da literatura que demonstram um melhor desempenho da técnica molecular utilizam espécimes biológicos relacionadas com a forma específica da TB extrapulmonar. Como o número de bacilos nas diversas amostras clínicas extrapulmonares é baixo, acredita-se que os resultados falso-negativos foram devidos principalmente à natureza paucibacilar dos líquidos e a uma distribuição irregular dos bacilos nas amostras durante a homogeneização. Desta forma, era de se esperar que a sensibilidade da qPCR piorasse quando se considerou a cultura como padrão ouro diferentemente do diagnóstico clínico com a resposta a terapêutica específica.

Quando se avaliou a técnica de qPCR utilizando a cultura como padrão ouro, obteve-se um desempenho inferior ao observado com o estabelecido na pesquisa. Isto reforça a limitação da cultura como teste padrão para o diagnóstico de TB extrapulmonar. Por outro lado, quando se considerou apenas o diagnóstico clínico



com a resposta terapêutica, tanto a sensibilidade como a especificidade do teste molecular aumentou consideravelmente atingindo valores similares ao encontrado com o padrão ouro definido no estudo.

Conclusões

A PCR em tempo real apresentou um bom limite de detecção, podendo ser utilizada como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da TB extrapulmonar. A cultura isoladamente não deve ser utilizada como padrão ouro em formas paucibacilares da doença.

Ficou demonstrado que quanto maior a diversidade de amostras biológicas submetidas a qPCR do mesmo paciente, maior será o desempenho da técnica molecular, sobretudo quando se trata de casos paucibacilares da doença. Para uma maior detecção de formas paucibacilares da doença, sobretudo em regiões de alta prevalência, mesmo tendo a possibilidade de realizar a qPCR em diversas amostras, sempre deve ser considerado a associação de critérios clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e terapêuticos.

A qPCR apresentou um bom desempenho para auxiliar o diagnóstico da TB extrapulmonar. Sendo necessário o maior número possível de amostras clínicas para o diagnóstico final em pacientes paucibacilares.

Referências

AMERICAN THORACIC SOCIETY, Diagnostic Standards and classification of tuberculosis in adults and children. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, New York, v. 161, n. 4, p. 1376-1395, 2015.

BERTOLLI F. C. História social da tuberculose e do tuberculoso: 1900-1950. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2010.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino serviço. 4.ed. rev. Rio de Janeiro, 2015.



DUCATI, R. G. et al. The resumption of consumption: a review on tuberculosis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.

ROSSO, et al. Evaluation of real-time PCR of patient pleural effusion for diagnosis of tuberculosis. BMC Research Notes, London, v.4,n.1,p.12-18, 2011.

