

A utilidade da biologia molecular no diagnóstico da tuberculose

FERNANDA CARVALHO DE QUEIROZ MELLO, JOSEANE FONSECA-COSTA

A partir dos anos 1950, com a descoberta da estrutura do ADN (ácido desoxirribonucléico), surgiu uma nova ciência, a biologia molecular, a qual se revelou uma ferramenta útil no diagnóstico de doenças infecciosas, através da identificação de uma seqüência gênica específica de um agente causador de doença, se presente no material biológico obtido do paciente. A partir de algumas pesquisas, realizadas para conhecimento do genoma do *Mycobacterium tuberculosis* (M. tb), foram descobertas as seqüências de bases que permitiriam caracterizar a presença do M.tb, através da identificação de seqüências de ADN ou de ácido ribonucléico (ARN). Na presença de um fragmento conhecido do genoma do M.tb, utilizando-se uma sonda genética (uma seqüência de poucos nucleotídeos complementares a uma seqüência específica do genoma do microorganismo a ser identificado), mostrou-se possível a formação de fitas duplas de ácido nucléico, através do pareamento de bases nucléicas, num processo denominado de hibridação. As sondas foram associadas a enzimas ou a substâncias radioativas para que os produtos da hibridação fossem identificados. Contudo, as sondas apresentaram baixa sensibilidade quando aplicadas diretamente em materiais clínicos paucibacilares, ou seja, com poucas cópias do ADN do M. tb⁽¹⁾.

Em 1983, Kary Mullis desenvolveu uma técnica que permitia a amplificação de uma seqüência do material genético de qualquer organismo, a partir de quantidades ínfimas, e que foi denominada de PCR (Polimerase Chain Reaction) ou reação de polimerização em cadeia. Em outubro de 1993, Kary Mullis foi agraciado com o Prêmio Nobel em Química por desenvolver esse processo que permitia que o ADN fosse multiplicado artificialmente através de ciclos repetitivos, com o uso de uma enzima, chamada de ADN polimerase. O princípio básico da técnica de PCR

consiste na amplificação de uma região selecionada do ADN de fita simples ou dupla, ou de ARN. A amostra a ser amplificada, ou seja, a seqüência alvo de um determinado gene ou parte dele, constitui uma seqüência de bases previamente conhecida. O conhecimento dessa seqüência permite a síntese de oligonucleotídeos, que serão os iniciadores da PCR, também denominados primers. Esta técnica reproduz a replicação do ADN in vitro, mas de um pequeno fragmento específico. Inicialmente, é feita a extração do ADN do microorganismo presente no espécime clínico a ser analisado. A seguir, uma série de reações cíclicas ocorre, e cada ciclo consiste de três etapas. A primeira, chamada de etapa de desnaturação, refere-se à separação da fita dupla de ADN em fita simples, através do aquecimento. A segunda, chamada de anelamento, consiste no pareamento das seqüências dos iniciadores às seqüências complementares no ADN alvo. A terceira etapa é denominada de fase de extensão, e desenvolve-se através da polimerização da nova fita de ADN com o auxílio da enzima Taq polimerase. Todo esse processo se dá em um termociclador, que gera automaticamente as modificações de temperatura necessárias a cada passo da reação. A partir de cada iniciador, uma cópia de ADN é sintetizada, e o produto ao final das três etapas é utilizado como substrato para as novas reações de amplificação, que se desenvolvem em série. Portanto, ocorre uma reação em cadeia e exponencial, permitindo a obtenção de novos produtos do ADN específico⁽²⁾. Assim, o fragmento alvo é amplificado, gerando múltiplas cópias, agora capazes de serem detectadas. Entre as técnicas para a sua detecção, temos a eletroforese em gel de agarose. Outras técnicas também podem ser usadas para a detecção do material amplificado, e algumas apresentam uma sensibilidade de detecção superior àquela da eletroforese. É o que ocorre quando associamos a PCR às técnicas de hibridação para detecção dos produtos amplificados⁽³⁾.

* Título de especialista pela Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia

Posteriormente, surgiram outros métodos de amplificação de ácido nucléico (AAN), além da PCR: a amplificação mediada por transcrição, a amplificação por transferência de fita e a reação em cadeia da ligase⁽⁴⁾.

A necessidade de um teste rápido para o diagnóstico laboratorial da tuberculose (TB) levou ao desenvolvimento dos métodos moleculares para a detecção e identificação do M.tb diretamente de espécimes clínicos, ou a partir das colônias isoladas em cultivo.

Vários sistemas de AANnucléicos têm sido descritos para a detecção do complexo M. tb diretamente de espécimes clínicos. Alguns constituem sistemas desenvolvidos em laboratórios de pesquisa, de caráter manual e denominados sistemas in house, enquanto outros já se encontram comercialmente disponíveis sob a forma de kits padronizados, semi ou totalmente automatizados: AMTD® e EMTD® - nova geração do AMTD® (Gen-Probe Inc, San Diego, CA); Amplicor® e Cobas Amplicor® (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ) - o último uma geração com automatização completa; LC® (Abbot Laboratories); e SDA® (Biosciences, Sparks, Md). Entretanto, apenas o AMTD®, o Amplicor® e o EMTD® foram aprovados pelo FDA para amostras respiratórias com baciloscopia positiva. Cabe ressaltar também que apenas o EMTD® foi aprovado para amostras respiratórias com baciloscopia negativa. Somente o EMTD® também teve a sensibilidade e a especificidade avaliadas entre infectados pelo HIV, de forma sistemática, e com rendimento inferior àquele encontrado entre pacientes soronegativos. Resumindo, esses testes foram aprovados apenas para uso rotineiro na suspeita clínica de TB pulmonar em pacientes adultos, não infectados pelo HIV, e sem tratamento prévio nos doze meses que antecederam o evento atual. Apesar desses testes apresentarem, em média, elevadas sensibilidade (95%) e especificidade (98%) em amostras com baciloscopia positiva, nas amostras com baciloscopia negativa, o rendimento é inferior⁽⁵⁾. Através da realização de uma meta-análise, a respeito do papel da técnica de PCR para o diagnóstico da TB pulmonar com escarro negativo à baciloscopia, os autores concluíram que a técnica de PCR não possui acurácia consistente o suficiente para ser indicada de forma rotineira para o diagnóstico de TB pulmonar paucibacilar⁽⁶⁾.

A recomendação atual do CDC para a interpretação dos resultados desses testes é, portanto, a seguinte: caso a baciloscopia e a técnica de amplificação de ácido nucléico, quando aplicadas à primeira amostra de escarro, forem ambas positivas, pode ser estabelecido o diagnóstico de TB pulmonar. Se a amostra apresenta baciloscopia positiva e amplificação negativa, deve ser feita uma avaliação técnica em busca da presença de inibidores para a amplificação. Caso não sejam detectados inibidores, conclui-se pelo diagnóstico de micobacteriose não tuberculosa. Se o escarro apresentar baciloscopia negativa, mas amplificação positiva, nova amostra deverá ser encaminhada para análise. Se esta for positiva, considera-se como caso de TB pulmonar em atividade. No caso de ambos, baciloscopia e amplificação, serem negativos, então uma nova amostra de escarro deverá ser enviada para amplificação. Se essa amostra for negativa, deve-se considerar como um caso de TB pulmonar “não transmissível”, mas a definição final do diagnóstico nesta situação terá como base o julgamento clínico contextualizado⁽⁷⁾. Deve-se notar que esses testes não se aplicam para o monitoramento rotineiro do tratamento, nem substituem a cultura⁽⁵⁾. Convém ressaltar também que há descrição de teste in house, no nosso meio, com resultados promissores em amostras com baciloscopia negativa, porém ainda em fase de validação interlaboratorial⁽⁸⁾.

A aplicação da biologia molecular, através da utilização das sondas genéticas descritas e associadas às técnicas de hibridação, como o sistema enzimático AccuProbe® (Gen-Probe, San Diego, CA), que emprega a hidrólise de éster de acridina na identificação do produto de hibridação, para a identificação de micobactérias que crescem em meio sólido ou líquido, como o BACTEC® 460 e o MGIT® 960, surge como alternativa aos testes bioquímicos necessários para a identificação de espécies. É de rápida e fácil execução, sem necessitar de aparelhagem muito sofisticada. O sistema Accuprobe - Gen Probe Inc. é validado e permite a identificação do complexo Mycobacterium tuberculosis, complexo Mycobacterium avium, M. avium, M. intracellulare, M. kansasii e M. gordonae, em poucas horas. A importância dessa aplicação é pontuada pelas II Diretrizes Brasileiras para Tuberculose, em que consta a indicação da identificação das micobactérias na suspeita de doença por micobactéria atípica, em particular entre imunossuprimidos, mas

devido ao custo elevado e à fase atual do conhecimento, é sugerido que tais testes moleculares sejam implantados em laboratórios de referência⁽⁹⁾

O estudo de Spada *et al*⁽¹⁰⁾ publicado neste número é de significativa relevância porque apresenta um exemplo dos possíveis benefícios da obtenção rápida da identificação de micobactérias, e da exequibilidade da implantação dessa técnica num laboratório de referência em nosso meio, com elevada demanda de pacientes imunossuprimidos sob suspeita de TB pulmonar, corroborando a indicação da sua aplicação nessas condições operacionais. Além disso, pontua a necessidade da interpretação dos resultados desses testes diante do contexto clínico e do panorama epidemiológico. Demonstra, também, a importância da utilização da evolução clínico-radiológica como padrão-ouro na avaliação dos testes moleculares, por causa das metodologias tradicionais disponíveis com suas conhecidas limitações. Concluindo, este estudo aponta para a necessidade da realização de estudos de custo-efetividade, para que um planejamento estratégico seja estabelecido para o controle da TB, particularmente no que tange à incorporação de novas metodologias diagnósticas pelos laboratórios de referência.

FERNANDA CARVALHO DE QUEIROZ MELLO
Professora Adjunta da Faculdade de Medicina
Universidade Federal do Rio de Janeiro

JOSEANE FONSECA-COSTA
Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica
Setor de Ciências Pneumológicas
Universidade Federal do Rio de Janeiro

REFERÊNCIAS

1. Aoki Y, Yamada H. Clinical application of microplate DNA hybridization procedure for rapid diagnosis of mycobacterial infections. *Tuber Lung Dis* 1994; 75: 213-9.
2. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990; 161: 977-81.
3. Kritski AL, Rossetti ML, Bonfim G, Castelo, A., Mello, FCQ. Reação em Cadeia de Polimerase (RCP/PCR) aplicada ao diagnóstico de tuberculose. *J Pneumol* 1997; 23: 33-42.
4. Drobniwski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 141-7.
5. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 161: 1376-95.
6. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, Weber DJ, Miller WC. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3233-40.
7. Nucleic Acid Amplification Tests for Tuberculosis. *MMWR* 2000; 49: 593-4.
8. Sperhake RD, Mello FCQ, Zaha A, Kritski A, Rossetti ML. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8:312-17.
9. II Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. *J Pneumol* 2004; 30: 8-11.
10. Spada DTA, Santos MAA, Almeida EA, Augusto M, Albarral MIP, Melo FAF. Avaliação de uma sonda genética (Sistema Accuprobe, Gen Probe®) para identificação de organismos do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, em comparação com métodos tradicionais de caracterização. *J Bras Pneumol* 2005; 31: 219-24.