

ARTIGO ORIGINAL

Relação entre a qualidade de amostras de escarro e o diagnóstico de micobacterioses por PCR

Maria Luiza Bazzo¹; Luiz Alberto Peregrino Ferreira²; Rosemeri Maurici da Silva³; Mara Scheffer⁴; Mariana Chagas⁵; João Laus Severino⁶; Darcita Bürger Rovaris⁷; Rosimara Nauck⁸; Paulo César Peregrino Ferreira⁹

Resumo:

O objetivo do estudo foi relacionar a quantidade de células, a presença de leucócitos e outros elementos no escarro com a positividade da reação de PCR, para diagnóstico de micobacterioses. Trinta e nove amostras positivas por baciloscopia para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), ou positivas em cultura em meio de Löwenstein-Jensen foram analisadas pelo método de coloração de Gram, para avaliação da biota e quantificação de células e leucócitos. Foram também submetidas à reação de PCR, para identificação de micobactérias. As amostras, de acordo com os resultados do Gram, foram classificadas como: ótima, boa, aceitável, ruim ou muito ruim. Do total de amostras analisadas, 26 (66,7%) apresentaram PCR positiva concordando com a baciloscopia, 12 (30,7%) PCR negativa e baciloscopia ou cultura positiva e uma (2,6%) amostra não pôde ter seu resultado avaliado, pois o DNA apresentou-se degradado após sucessivas extrações. Dentre as amostras

1. Mestre em Ciências, Professora Assistente do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina, responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular LAQUAS/ ACL/ UFSC.
2. Mestre em Ciências, Professor Titular do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina e Coordenador do Laboratório Avançado de Qualidade em Saúde LAQUAS/ACL.
3. Doutora, Professora do Curso de Medicina da UNISUL, Médica Pneumologista do Hospital Nereu Ramos.
4. Especialista, Bioquímica do Setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas - HU - UFSC.
5. Graduanda do Curso de Farmácia e Bioquímica da UFSC, estagiária do Laboratório de Biologia Molecular - ACL - LAC - UFSC.
6. Especialista, Bioquímica do Setor de Tuberculose - LACEN- SC.
7. Especialista, Bioquímica do Setor de Tuberculose - LACEN- SC.
8. Especialista, Bioquímica do Setor de Tuberculose - LACEN- SC.
9. Doutor, Professor Titular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

com PCR negativo e baciloscopia ou cultura positiva, 9 (23,0%) apresentaram qualidade muito ruim no Gram, 2 (5,2%) qualidade ruim e 1 (2,6%) apresentou qualidade aceitável. Os resultados mostraram que a qualidade do escarro influencia diretamente na positividade da PCR e que, quanto mais representativa do trato respiratório inferior for a amostra, melhor será o rendimento da detecção molecular.

- Descritores:**
1. *Micobactéria;*
 2. *PCR;*
 3. *Coloração de Gram.*

Abstract:

The aim of this study was to relate the quantity of cells, the presence of leukocytes and other elements in sputum with the polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of micobacterioses. Thirty-nine sputum samples which were positive to alcohol-acid fast bacilli (AFB) or culture on Löwenstein Jensen (LJ) medium were investigated by Gram stain for evaluation of the biota, leukocytes and cells. According to the leukocytes and cells present on the Gram-stained slides, samples were classified as excellent, good, acceptable, bad or very bad. The samples were submitted to PCR with mycobacterium-specific primers. Twenty-six samples (66.7%) were positive for both AFB and PCR and 12 (30.7%) were negative for PCR-specific primers, in spite of being AFB-positive or LJ-positive. In one sample (2.6%), the PCR was not performed due to the DNA degradation after extraction. Among the negative PCR and positive AFB or LJ, 9 (23%) samples out of 12 were classified as very bad according to evaluation by Gram

staining, 2 (5.2%) were classified as bad, and 1 (2.6%) was considered to be acceptable. These results indicate that the quality of the sputum sample is important for the positivity of PCR and that samples representing the lower respiratory tract are best for PCR detection.

Keywords: 1. *Mycobacterium*;
2. PCR
3. Gram staining.

Introdução

A tuberculose é uma das mais antigas doenças da humanidade e permanece, ainda nos dias de hoje, como uma das principais causas de morte entre as doenças infecciosas, a despeito do uso mundial de vacinas atenuadas e de diversos antibióticos.¹

A Organização Mundial de Saúde estima, em dados de 2002, que da população mundial de 6 bilhões de pessoas, 1,9 bilhões está infectada com *M. tuberculosis*. A cada ano 16 milhões de pessoas adoecem, 8,2 milhões de novos casos são diagnosticados e 1,8 milhões de pessoas morrem por consequência da tuberculose. Dessas mortes, 98% acontecem em países em desenvolvimento.²

No Brasil, a incidência estimada é de 50 a 80 casos/100.000 habitantes.³ Dados do Ministério da Saúde, publicados no Anuário Estatístico de Saúde do Brasil, 2001⁴, mostram uma incidência geral de 47,7 casos/100.000 habitantes. A incidência nas regiões brasileiras apresenta grande heterogeneidade. O estado do Rio de Janeiro apresenta incidência de 88,6 casos/100.000 habitantes, liderando o índice no País.

Os três estados do sul apresentam incidência de 37 casos/100.000 habitantes. Desses, Santa Catarina apresenta 29,6 casos/100.000 habitantes, constituindo-se em um dos estados com menor incidência. Essa incidência, no entanto, é muito superior a observada em países desenvolvidos, como por exemplo, menos de 10 casos/100.000 habitantes nos Estados Unidos da América.^{1,3}

O Estado de Santa Catarina, mesmo apresentando uma incidência global inferior a do resto do país, tem uma distribuição muito irregular do número de casos. O município de Itajaí apresenta uma incidência de 84,7 casos/100.000 habitantes enquanto São Miguel do Oeste apresenta 4,2 casos/100.000 habitantes.⁵

Medidas urgentes devem ser tomadas no sentido de intervir diretamente na cadeia de transmissão da tuberculose para diminuir o número de casos. No Brasil, o diagnóstico laboratorial dos casos suspei-

tos tem sido realizado com os testes tradicionais de baciloscopia e cultura.⁶

Desses testes, a baciloscopia permite um diagnóstico rápido, no entanto, por diversos motivos muitos indivíduos com tuberculose não eliminam bacilos em número suficiente para serem detectados na baciloscopia, ficando o diagnóstico reservado para a cultura, que em muitos casos, apresenta positividade apenas na 6ª semana após o cultivo.⁶

Behr et al⁷ mostraram que nos episódios em que *M. tuberculosis* foi transmitido de indivíduo para indivíduo, em pelo menos 17% dos casos, o paciente-fonte apresentava baciloscopia negativa.

Os testes moleculares, como a detecção do DNA de micobactérias pela reação em cadeia da polimerase (PCR), podem ser uma alternativa para agilizar o diagnóstico.⁸ Esses testes ainda apresentam problemas de sensibilidade que devem ser solucionados para que efetivamente contribuam para o diagnóstico e a intervenção na cadeia de transmissão.⁸

Estudos com secreções traquiobronquiais revelam a presença de muitos elementos nesse material, dos quais destacamos a lisozima e a calicreína. Existem, também, outras enzimas que provavelmente se originam de células mortas ou danificadas, como: desidrogenase láctica (LDH) e deoxiribonucleases (DNAses).⁹

Muitos trabalhos mostram que há uma tendência de que o gel de secreções traquiobronquiais se dissolva durante estocagem. Isso pode ocorrer devido a presença de enzimas proteolíticas.⁹

Nossa experiência tem apontado para o fato de que, o principal problema relacionado com a baixa sensibilidade encontrada na PCR para detecção do DNA de micobactérias, pode estar relacionado com a amostra.

Com o objetivo de relacionar a quantidade de células, a presença de leucócitos e outros elementos no escarro com a positividade da PCR para diagnóstico de micobacterioses, realizamos este estudo.

Métodos

Foram incluídas no estudo, amostras de escarro, provenientes de todo o Estado de Santa Catarina e rotineiramente enviadas para diagnóstico laboratorial da tuberculose no LACEN-SC. Após a realização da baciloscopia para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) pela coloração de Ziehl-Nielsen e da cultura para micobactérias em meio de Löwenstein-Jensen⁶, 39 amostras positivas foram selecionadas aleatoriamente e enviadas para o estudo.

As características de cada amostra foram avaliadas pela observação do esfregaço, que foi corado pelo método de Gram.¹⁰ Foram consideradas: a quantidade de células epiteliais e leucócitos na amostra e a presença de aglomerados bacterianos. Como aglomerados definimos os grumos de bactérias com características morfológicas e tintoriais variáveis, aderidas sobre células epiteliais ou soltos, típicos de flora oral.

Para o diagnóstico molecular das micobactérias, os DNA das amostras foram extraídos segundo Böddinghaus et al.¹¹

Como controle de qualidade das extrações e da presença de inibidores, todos os DNA foram submetidos à reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) tendo sido utilizado um par de oligonucleotídeos iniciadores (primers) para eubactérias F285 e ZR 244, gerando um fragmento de 349 pares de base.¹²

Na detecção de micobactérias, pela reação de PCR, foi utilizado um par de oligonucleotídeos iniciadores específicos: o F285 e o MYC 264, gerando um fragmento de 1030 pares de base.¹² Em todas as reações foram incluídos controles positivos e negativos. Como controle positivo utilizamos DNA de Bacilo Calmette-Guérin M.tuberculosis (BCG).

Os produtos das PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, durante 10 minutos, sob tensão de 200 volts. Após a coloração por brometo e etídium, os géis foram visualizados em luz ultravioleta e fotografados.

Resultados

De acordo com a avaliação pelo Gram, as amostras foram classificadas como ótima, boa, aceitável, ruim e muito ruim.

Tabela 1 - Classificação das amostras de acordo com a avaliação da bacterioscopia pelo método de Gram.

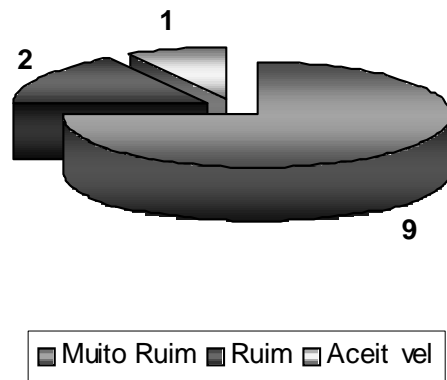
Classificação	Gram	Número de Amostras
Ótima	+++leucócitos/+células	7
Boa	+++leucócitos/++células	4
Aceitável	++leucócitos/++células/aglomerados	10
Ruim	+leucócitos/+++células/aglomerados	9
Muito Ruim	+leucócitos/+ou++células/mat. escasso	9

+++ muitos, ++ poucos, + raros.

A Tabela 1 mostra os resultados do Gram e o número de amostras em cada categoria.

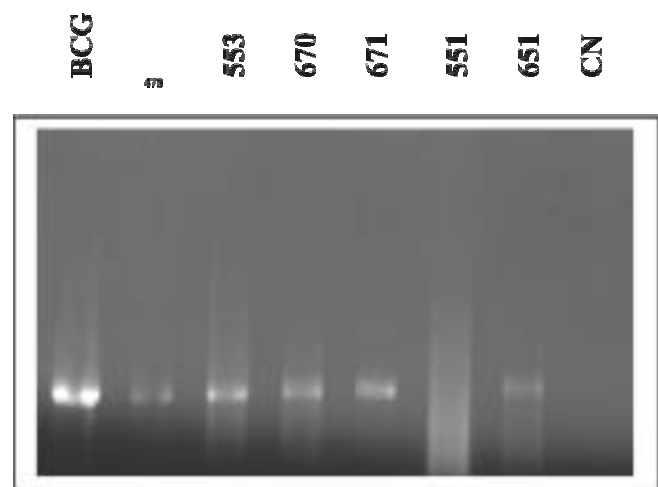
A qualidade das amostras com PCR negativa e baciloscopia ou cultura positivas está apresentada na Figura 1.

Figura 1 - Qualidade das amostras avaliada pelo método de Gram entre as amostras negativa na PCR e positivas na baciloscopia ou cultura



A Figura 2 apresenta alguns resultados de DNA de amostras amplificadas por PCR com iniciadores para micobactérias.

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos de PCR de DNA amplificados com primers MYC 264 e F 285. Canaleta 1: BCG = Bacilo Calmette-Guérin M.tuberculosis, canaletas de 2 a 7: os números 479, 553, 670, 671, 551 e 651 correspondem a amostras clínicas, canaleta 8: CN = Controle Negativo.



Discussão

A comparação dos resultados das PCR para micobactérias, com os resultados das baciloscopias ou culturas mostraram que em 26 (66,7%) amostras houve concordância dos resultados positivos das PCR com os da baciloscopia ou cultura. No entanto, em 12 (30,7%) amostras a PCR se apresentou repetidamente negativa, contrariando a baciloscopia ou a cultura que se apresentaram positivas. Uma (2,6%) amostra não pôde ter seu resultado avaliado porque o DNA se apresentou degradado mesmo após sucessivas extrações.

Das amostras com resultados concordantes entre a PCR e a baciloscopia ou cultura, apenas uma apresentou qualidade muito ruim, mas apresentava muitos (+++) BAAR, fato que pode ter contribuído para a positividade da PCR.

A Figura 2 apresenta alguns resultados de DNA de amostras amplificadas por PCR com iniciadores para micobactérias e como pode ser observado, as amostras 479, 553, 670 e 651 apresentam indícios de degradação mas podem ainda ser consideradas positivas, já a amostra 555 não pode ter seu resultado avaliado visto que apresenta o DNA totalmente degradado.

Nossos resultados mostram que escarros que apresentam muitas células, muitas bactérias e muitos restos celulares têm maior probabilidade de apresentarem resultados negativos na PCR. Esses achados parecem indicar para o fato de que, a possível presença de enzimas, que podem ser provenientes dos leucócitos degenerados, pode contribuir para que ocorra degradação do DNA.

Além disso, o Gram indicou que muitas amostras são predominantemente de origem oral, não sendo representativas do trato respiratório inferior.

Segundo Skerret et al.¹³ uma amostra de escarro com menos do que 10 células epiteliais escamosas e mais do que 25 neutrófilos, por pequeno aumento de microscópio, com evidência de um monotipo de bactérias, em grande aumento de microscópio são indicadores acurados e de confiança para início de antibioticoterapia.

A despeito de todos esses indicadores, os testes tradicionais para diagnóstico de micobactérias têm apresentado positividade superior à da PCR. No entanto, nosso estudo tem sido realizado com amostras estocadas, sujeitas à degradação e destruição das micobactérias.⁷

Dentre as diversas observações que fizemos durante a estocagem do escarro, verificamos que nas baciloscopias que realizamos nas amostras estocadas, imediatamente antes da extração do DNA, encontramos sempre

um número de BAAR inferior ao número encontrado na primeira baciloscopia realizada com a amostra fresca.

Conclusões

Nossos resultados mostraram que a qualidade do escarro influencia diretamente na positividade da PCR e que, quanto mais representativa do trato respiratório inferior for a amostra, melhor será o rendimento da detecção molecular.

Esses dados sugerem a necessidade de compreender melhor a participação dos constituintes do escarro na eficiência da PCR, como também de realizar a reação em amostra fresca e solicitar uma segunda amostra sempre que a PCR se mostrar negativa.

Referências Bibliográficas:

1. Smith I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev 2003; 16:463-96. Epidemiological Status of TB - Region of the Americas, 2004. Disponível em: www.who.org.
2. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Ravigliano MC. Global Burden of Tuberculosis: estimated Incidence, Prevalence, and Mortality by Country. JAMA 1999; 282:677-86.
3. www.datasus.gov.br
4. Santa Catarina. Secretaria de Estado da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. 2003.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro: 1994.
6. Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell A, Ponce de Leon A, Daley CL, et al. Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients smear-negative for acid-fast bacilli. Lancet 1999; 353:444-9.
7. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, Weber DJ, Miller WC. Assessment by Meta-Analyses of PCR for Diagnosis of Sear-Negative Pulmonary Tuberculosis. J Clin Microbiol 2003; 41:3233-40.
8. Yager H. Tracheobronchial secretions. Am J Med 1971; 50:493-508.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. TELELAB - Técnica de Coloração de Gram. Brasília: Programa Naci-

- onal de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS., 1997, p.80.
11. Boddinghaus B, Rogall T, Florhr T, Blocker H, Bottger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J Clin Microb 1990; 28:1751-9.
 12. Aleixo AG, Kroon EG, Campos MAS, Margutti-Pinto ME, Bonjardim CA, Ferreira PCP. Heteroduplex Mobility Assay for Rapid, sensitive and specific Detection of Mycobacteria. Diagn. Microbiol Infect Dis 2000; 36:225-35.
 13. Skerret JS. Diagnostic testing for community-acquired pneumonia. Clin Chest Med 1999; 20:531-48.

Endereço para correspondência:

Maria Luiza Bazzo.

Departamento de Análises Clínicas - CCS - UFSC.
Campus Universitário - Trindade - Florianópolis-SC.

CEP: 88040-900

E-mail: mlbazzo@ccs.ufsc.br,

mlbazzo@yahoo.com.br

Fone: (48) 331 9113 - ramal 219