

## REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NA IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis* COMPARADA AOS MÉTODOS CONVENCIONAIS DE DIAGNÓSTICO

### POLYMERASE CHAIN REACTION IN IDENTIFICATION OF *Mycobacterium tuberculosis* COMPARED TO CONVENTIONAL DIAGNOSTIC METHODS

<sup>1</sup>ANDRADE JUNIOR, S.S, <sup>2</sup>ROMANO, A.R, <sup>3</sup>DEPIZZOL, P.H, <sup>4</sup>GARCIA, A.  
<sup>1,2,3e4</sup>Departamento de Farmácia – Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

#### RESUMO

Considerada uma técnica de biologia molecular revolucionária, a reação em cadeia da polimerase (PCR) permitiu o rápido desenvolvimento do estudo de sequências de ácidos nucleicos. A aplicação da técnica de PCR e suas variações em diagnósticos moleculares tem se mostrado de grande efetividade, especialmente na identificação de doenças cujo diagnóstico precoce é crucial no sucesso do tratamento, a exemplo da tuberculose, doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, também chamado de bacilo de Koch. Trata-se de uma micobactéria BAAR (bactéria álcool ácido resistente), parasita intracelular. Diante disto, este trabalho tem por objetivo descrever a importância e eficácia da PCR na identificação do bacilo-de-Koch quando comparado aos métodos convencionais de identificação. Para isto, foi realizado um levantamento a respeito do tema nas bases de dados Scielo, NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e Google Acadêmico. Pela sua alta sensibilidade e por utilizar iniciadores que são específicos para micobactérias, em especial as da espécie *tuberculosis*, a reação de PCR é capaz de, em poucas horas, quando comparado aos métodos convencionais que levam até dias, determinar a presença do patógeno na amostra e ajudar na decisão da melhor terapêutica para o caso. Embora seja uma técnica muito sensível na detecção destes patógenos, ainda há necessidade de padronização, pois os resultados podem variar entre laboratórios dependendo das condições de manipulação, reagentes e iniciadores. Contudo trata-se de uma técnica promissora, rápida e precisa, porém, padronizações ainda são necessárias para o sucesso da técnica.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, Diagnóstico, Reação em cadeia da polimerase, PCR, Bacilo de Koch.

#### ABSTRACT

Considered a revolutionary molecular biology technique, the polymerase chain reaction (PCR) allowed the rapid development of the study of nucleic acid sequences. The application of the PCR technique and its variations in molecular diagnostics has been shown to be highly effective, especially in the identification of diseases whose early diagnosis is crucial in the success of treatment, such as tuberculosis, a disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, also called bacillus-de-Koch. It is a mycobacterium BAAR (acid alcohol resistant bacterium), intracellular parasite. Therefore, this work aims to describe the importance and efficacy of PCR in the identification of Koch bacillus when compared to conventional methods of identification. For this, a survey was made regarding the subject in the databases Scielo, NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) and Google Scholar. Because of its high sensitivity and the use of primers that are specific for mycobacteria, especially those of the tuberculosis species, the PCR reaction is able to determine the presence of the pathogen in the sample in a few hours when compared to the conventional methods that take up to days and help in deciding the best therapy for the case. Although it is a very sensitive technique in the detection of these pathogens, there is still a need for standardization, as the results may vary between laboratories depending on the handling conditions, reagents and primers. However, it is a promising technique, fast and precise, but standardizations are still necessary for the success of the technique.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, Diagnosis, Polymerase chain reaction, PCR, Koch's bacillus.

## INTRODUÇÃO

Considerada uma técnica de biologia molecular revolucionária, a reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) permitiu o rápido desenvolvimento do estudo de sequências de ácidos nucleicos (MOLINA et al, 2004). Desenvolvida por Kary Banks Mullis (prêmio Nobel de química de 1993 pelo desenvolvimento dessa técnica) em abril de 1983, essa técnica de biologia molecular consiste na síntese enzimática de cópias de ácidos nucleicos (COSTA, 2010).

A técnica de PCR promove, por meio de etapas de variação de temperatura, a duplicação de cadeias de DNA *in vitro*. A reação de amplificação de DNA por PCR envolve o emprego dos quatro nucleotídeos (dNTP's) do DNA, sequências iniciadoras (*primers*) e uma DNA polimerase termoestável. Assim, é possível a obtenção de muitas cópias de uma sequência específica de ácido nucleico, a partir de uma fita molde. Desde a introdução da técnica de PCR, rápidos avanços nas técnicas de genética molecular tem revolucionado a prática da patologia, anatomia e análises clínicas. As técnicas moleculares são agora aplicáveis a todas as áreas do laboratório clínico. Na anatomia patológica, apesar das análises morfológicas ainda serem a principal ferramenta de trabalho, resultados dos estudos de genética molecular têm integrado, cada vez mais, os diagnósticos nas análises cirúrgicas (MOLINA, 2004).

O *M.tuberculosis* ou bacilo de Koch, é a bactéria que provoca a maioria dos casos de tuberculose. Foi descrita pela primeira vez em 24 de março de 1882 por Robert Koch, que subsequentemente recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia/Medicina por esta descoberta em 1905. Ela é uma micobactéria BAAR (bactéria álcool ácido resistente), parasita intracelular. Segundo o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, organizado pelo Ministério da Saúde em 2004, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a tuberculose em estado de emergência no mundo, onde ainda é a maior causa de morte por doença infecciosa em adultos. Segundo estimativas da OMS, dois bilhões de pessoas correspondendo a um terço da população mundial está infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Destes, 8 milhões desenvolverão a doença e 2 milhões morrerão a cada ano (CAMARGO; SILVA, 2015).

O objetivo do presente trabalho foi demonstrar a importância da técnica de PCR no diagnóstico da tuberculose e sua precisão na identificação do bacilo de Koch quando comparado com as técnicas tradicionais de identificação.

## METODOLOGIA

Foi realizada uma busca em bancos de dados como Scielo, NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e Google Acadêmico, livros, artigos utilizando as seguintes palavras chave: PCR, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnostico *Mycobacterium tuberculosis*. Os artigos foram selecionados de acordo com o conteúdo pertinente à pesquisa.

## DESENVOLVIMENTO

A técnica de PCR possibilita uma nova estratégia na análise dos genes, dispensando todas as trabalhosas etapas de clonagem gênica. Ainda, há a possibilidade de adaptações da técnica de PCR a fim de melhorar a especificidade e a eficiência da reação. Muitas micobactérias não-tuberculosas são de importância médica, pois ocorrem mais frequentemente em países desenvolvidos, nos quais a incidência de tuberculose é baixa. A detecção e diferenciação rápida de infecções causadas por micobactérias não-tuberculosas de micobactérias tuberculosas mostra-se uma estratégia precoce para o tratamento, haja vista que muitas micobactérias não-tuberculosas são resistentes aos antibióticos usados para tuberculose (MACENTE, 2009).

Pela sua alta sensibilidade e por utilizar iniciadores que são específicos para micobactérias do complexo *tuberculosis*, a reação de PCR é capaz de, em poucas horas, determinar a presença do patógeno na amostra e ajudar na decisão da melhor terapêutica para o caso. Em condições extremas, esta técnica pode ser refinada para torná-la capaz de determinar não só a presença, mas também as estirpes resistentes aos tuberculostáticos disponíveis para o tratamento da tuberculose, além de estudos de epidemiologia molecular e tipagem de estirpes em cultura; ou seja, esta técnica pode ser utilizada como alternativa para os métodos tradicionais de detecção do patógeno. Pelo descrito, a escolha do DNA alvo e a definição dos iniciadores dentro da sequência do DNA são fatores determinantes para sua acuidade. A escolha dos diversos iniciadores utilizados na PCR para a identificação do *M.tuberculosis* tem apresentado resultados variáveis, principalmente em relação à sensibilidade do teste. Por esta razão, vários autores pesquisaram a utilização e avaliação de diferentes iniciadores no teste. Os iniciadores mais estudados são o IS6110, GroEL (65 kDa), PhoS, CIE Ag78 ou Pab (38 kDa) e MPB64 (23 kDa) (MACENTE, 2009).

Entre os iniciadores estudados, o IS6110 (Tb 294: 5'-GGA CAA CGC CGA ATT GCG AAG GGC-3' e Tb 850: 5'-TAG GCG TCG GTG ACA AAG GCC ACG-3', e/ou Tb 505: 5'-ACG ACC ACA TCA ACC-3' e Tb 670: 5'-AGT TTG GTC ATC AGC C-3') (WILSON et al., 1993) é o mais usado por ser uma sequência repetitiva no genoma do *M. tuberculosis* (de 1 a 20 cópias por célula) enquanto as outras sequências estão sempre em um único local no material genético da micobactéria. A existência da sequência repetitiva IS6110 no genoma prevê uma alta sensibilidade e especificidade na prova de PCR, pois quando múltiplas cópias de DNA alvo estão presentes, a sensibilidade de detecção de *M. tuberculosis* aumentará em proporção ao número de cópias. Isto é uma grande vantagem em amostras clínicas com pequeno número de micobactérias, como pode acontecer em determinados casos de tuberculose (MACENTE, 2009).

O segundo iniciador de opção é o fragmento genômico MPB64, que foi demonstrado ser altamente específico para *M. tuberculosis*. Comparativamente ao IS6110, gerou menos resultados falso-positivos, porém com a necessidade de realizar adaptações na reação de PCR. Além disso, a qualidade da amostra pode influenciar diretamente na positividade da PCR. Quanto mais representativa for a amostra, melhor será o rendimento da detecção molecular. Quando ocorre uma baixa sensibilidade da PCR, esta pode ser justificada pela introdução de substâncias inibidoras durante o procedimento de extração (ASSIS et al, 2007). Para evitar esta inibição, alguns autores defendem a lavagem exaustiva do DNA obtido para eliminação de substâncias inibidoras da enzima *Taq* DNA polimerase (MACENTE, 2009).

Os sintomas da tuberculose, em humanos, é compatível com o de uma doença infecciosa de curso geralmente crônico, e destaca-se os seguintes sintomas; febre, emagrecimento, astenia e, em sua forma clínica mais prevalente, tosse com expectoração que pode evoluir para escarros sanguíneos e hemoptise. O quadro clínico varia, evidentemente, com as diversas formas extrapulmonares que a tuberculose pode apresentar e a gravidade do caso. Durante a investigação a história de contato com indivíduos ou animais tuberculosos, é de fundamental importância para a suspeita diagnóstica (CORRÊA, 2011).

## **Métodos convencionais utilizados em diagnósticos**

### **Baciloscopia**

Para a visualização dos bacilos Robert Koch corava os esfregaços com uma solução alcalina de azul de metileno durante 24 horas. Paul Ehrlich em 1882 foi o primeiro que assinalou a propriedade tintorial característica do bacilo da tuberculose, a ácido-resistência, ao observar que os bacilos corados durante 15- 30 minutos com violeta de metila ou fucsina básica em óleo de anila, resistiam ao descoramento pelo ácido nítrico. Ziehl descobriu um método muito semelhante ao de Ehrlich, no qual o óleo de anila havia sido substituído por fenol essa modificação melhorava significativamente a estabilidade da coloração. Neelsen, em 1883, introduziu o uso de fucsina ao invés de violeta de metila e empregou o ácido sulfúrico no lugar do ácido nítrico. Até hoje é utilizado este padrão de coloração, chamado de método de Ziehl-Neelsen onde o bacilo se cora de vermelho brilhante sobre um fundo azul. (CORRÊA, 2011).

A baciloscopia, apesar de sua simplicidade e baixo custo, tem como principal desvantagem o fato de ser negativa em 30 a 50% dos casos de pessoas infectadas com *M. tuberculosis*, em parte devido à necessidade da presença de pelo menos 5000 bacilos/mL de escarro, além disso esta técnica não permite distinguir os membros da família *Mycobacteriaceae*. (CORRÊA, 2011).

### **Cultura**

A cultura é o que se chama de Padrão Ouro, pois é o método já certificado para este diagnóstico. Apresenta sensibilidade maior que a baciloscopia para a detecção da micobactéria, como vimos, para uma baciloscopia de escarro ser positiva, são necessários 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro deste espécime, a cultura é capaz de detectar, pela multiplicação do agente, apenas 10 bacilos por mililitro do espécime clínico analisado. Desta forma, a cultura assume uma grande importância para a detecção de BAAR em espécimes extrapulmonares, e dos suspeitos de tuberculose pulmonar persistentemente negativos à baciloscopia. Além de que, o cultivo permite posterior identificação da micobactéria isolada (e/ou complexo) assim como a realização de testes de sensibilidade a antibióticos. As micobactérias tem a temperatura ideal de crescimento de 37°C em pH de 6,5. As principais desvantagens diagnósticas, estão no tempo demasiadamente prolongado entre a inoculação e o surgimento de colônias macroscopicamente visíveis (24 a 40 dias) e o fato de requerer

organismos viáveis para sua realização, exigindo uma adequada manipulação dos espécimes clínicos (CORRÊA, 2011).

### **Raio X**

O exame radiológico é amplamente utilizado em humanos, é um método auxiliar, utilizado em pacientes sintomáticos e negativos à baciloscopia. O método se baseia na presença de opacidade radiológica. Contudo é importante lembrar que não existe imagem patognomônica de tuberculose na radiografia do tórax e sim, imagem sugestiva, visto que lesões pulmonares semelhantes às causadas pela tuberculose podem ocorrer em outras doenças. A tomografia computadorizada do tórax também é um método radiológico porém de resolução e mais sensível do que a radiografia de tórax, mas apresenta alto custo, só estando disponível em centros de referência e também não serve como diagnóstico definitivo (CORRÊA, 2011).

Quando comparado o custo-benefício da PCR em relação às técnicas padrão utilizadas hoje no diagnóstico da tuberculose como cultura, raio x e baciloscopia, observa-se que o tempo necessário para a realização da PCR é, em média, um dia, enquanto as técnicas normalmente utilizadas variam entre 4 a 8 semanas reduzindo, assim, o tempo para o diagnóstico final. Considerando apenas os reagentes usados em ambos os métodos de identificação, a PCR é 50% mais barata do que a identificação microbiológica. Além disso, uma única pessoa pode executar a técnica de PCR. A identificação microbiológica usualmente envolve diferentes pessoas para esterilização, preparação dos meios e manejo das culturas. A manipulação de bactérias é mínima com PCR, pois não há necessidade de cultivo e crescimento de microrganismos, proporcionando otimização da segurança no laboratório (MACENTE, 2009).

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A reação em cadeia de polimerase (PCR) aumentou a acurácia diagnóstica, mas as técnicas ainda não foram padronizadas e os resultados variam entre os laboratórios. Também tornou-se possível determinar o genótipo do patógeno por método de diagnóstico molecular em laboratórios clínicos, o que pode ser útil em situações específicas. A disponibilidade de diferentes testes viabiliza o diagnóstico precoce, minimizando o potencial para disseminação da infecção e torna relevante a discussão das indicações de cada teste a partir de sua sensibilidade e especificidade.

Há quase vinte anos após os primeiros relatos do emprego da PCR para o diagnóstico molecular terem sido publicados, tais testes ainda não foram disponibilizados comercialmente e não são usados além do ambiente de pesquisa.

Além do custo, pode ser citada a necessidade de sua execução em laboratórios com elevada tecnologia e com espaço exclusivo para a sua realização, como os principais fatores limitantes no que diz respeito ao emprego do teste de PCR em situação ambulatorial ou hospitalar, ou mesmo na rotina dos bancos de sangue. Como os protocolos não são padronizados, os resultados variam entre os laboratórios.

Diante desta situação, existe a necessidade de padronização das técnicas de PCR em diagnósticos por meio de mais estudos de como devem ser os padrões-ouro, para depois ocorrer uma padronização nas técnicas que culminem, inclusive, na sua redução de custo, tornando-a disponível nos ambientes clínicos e hospitalares.

## REFERÊNCIAS

ASSIS, Nelma Cristina Sousa de, LOPES, Maria Luiza, CARDOSO Ninarosa Calzavara, COSTA, Maurimélia Mesquita da, SOUSA, Cintya de Oliveira, LIMA, Karla Valéria Batista. **Diagnóstico Molecular da Tuberculose Pulmonar**. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v43n1/a03v43n1.pdf>. acessado em 09 de setembro de 2018.

CAMARGO, C.F., SILVA, P.R.Q. **Aplicação das técnicas de PCR e suas técnicas derivadas em diagnóstico molecular**. Disponível em: <http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/CLEYTON%20FLORENCIO%20DE%20CAMARGO%20E%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>. acessado em 09 de setembro de 2018.

CORRÊA, F. A. F. **Formas de diagnóstico de Mycobacterium tuberculosis e Mycobacterium bovis**. 2011. 30f. Pós graduação em ciência animal - Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2011.

COSTA, Ronaldo de Jesus. **Técnica de Biologia Molecular: PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)**. Disponível em: <http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/8577/tecnica-de-biologia-molecularp-cr-reacao-em-cadeia-da-polimerase>. acessado em 09 de setembro de 2018.

MOLINA, Adriana Lopes, TOBO, Patrícia Renovato. **Uso das Técnicas de Biologia Molecular para Diagnóstico**. Disponível em: <http://www.einstein.br/biblioteca/artigos/Vol2Num2/Serie%20Biologia%20parte%202.pdf>. acessado em 09 de setembro de 2018.

MACENTE, Sara. Diagnóstico Molecular De M. Tuberculosis: Uma Revisão De Técnicas. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 2, p. 225 -231, mai./ago. 2009

WILSON, Stuart, McNERNEY, Ruth, NYE, Pamela, GODFREY-FAUSSETF, Peter, STOKER, Neil, VOLLER, Alister. Progress toward a Simplified Polymerase Chain Reaction and Its Application to Diagnosis of Tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.4, p. 776-782. 1993.