

# Artigo Original

## Estudo comparativo entre um sistema de sonda genética e métodos clássicos na identificação das micobactérias\*

Gene probes versus classical methods in the identification of mycobacteria

Andréa Gobetti Vieira Coelho<sup>1</sup>, Liliana Aparecida Zamarioli<sup>2</sup>, Clemira Martins Pereira Vidal Reis<sup>3</sup>, Ana Carolina Chiou Nascimento<sup>4</sup>, Juliana dos Santos Rodrigues<sup>5</sup>

### Resumo

**Objetivo:** O aparecimento da co-infecção tuberculose/HIV e o aumento de casos de doenças provocadas por micobactérias não-tuberculosas (MNT) exigem repostas laboratoriais rápidas tanto no isolamento como na identificação das micobactérias. O objetivo deste trabalho foi avaliar a identificação das micobactérias através de sonda genética em comparação com os métodos bioquímicos clássicos. **Métodos:** Entre 2002 e 2004, foram analisadas 178 culturas de micobactérias, confirmadas como bacilos álcool-ácido resistentes e obtidas de isolados clínicos de pacientes sintomáticos respiratórios ou com suspeita clínica de tuberculose pulmonar e/ou micobacterioses, atendidos nas Unidades de Saúde da Baixada Santista. **Resultados:** A sonda genética identificou 137 amostras (77%) como complexo *Mycobacterium tuberculosis* e 41 (23%) como MNT. A discordância observada de 3% entre os métodos ocorreu apenas no ano de implantação (2002). Ao comparar os métodos, a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da sonda genética foram 98%, 93%, 98% e 93%, respectivamente. **Conclusões:** Apesar do custo elevado, a identificação de micobactérias pela técnica molecular é mais rápida: máximo de 3 h vs. 28-30 dias para os métodos clássicos. A utilização de sondas genéticas é uma técnica molecular validada, simples e disponível no mercado, com elevada especificidade, sensibilidade e rapidez, o que justifica sua implantação e uso rotineiro em laboratórios de referência, facilitando o diagnóstico e permitindo uma intervenção clínica ágil.

**Descritores:** Mycobacterium tuberculosis; Tuberculose/diagnóstico; Mycobacterium/classificação; sondas DNA.

### Abstract

**Objective:** The emergence of tuberculosis/HIV co-infection and the increase in the number of cases of infection with nontuberculous mycobacteria (NTM) require rapid laboratory test results in the isolation and identification of mycobacteria. The objective of this study was to evaluate the identification of mycobacteria by means of gene probes in comparison with that obtained using classical biochemical methods. **Methods:** Between 2002 and 2004, 178 mycobacterial cultures, all testing positive for acid-fast bacilli, were analyzed. Samples were obtained from clinical specimens of patients with respiratory symptoms or with clinical suspicion of pulmonary tuberculosis/mycobacteriosis who were treated in the greater metropolitan area of Santos. **Results:** The gene probe identified 137 samples (77%) as *Mycobacterium tuberculosis* complex and 41 (23%) as NTM. Discordant results between the methods (3%) were obtained only in the year of implementation (2002). When comparing the methods, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the gene probe method were 98%, 93%, 98% and 93%, respectively. **Conclusions:** Despite the cost, the identification of mycobacteria using the molecular technique is faster: maximum 3 h vs. 28-30 days for classical methods. The use of gene probes is a validated molecular technique. It is fast, easy to use and readily available on the market. It has high specificity and sensitivity, which justifies its implementation and routine use in referral laboratories, since it facilitates the diagnosis providing agile clinical interventions.

**Keywords:** Mycobacterium tuberculosis; Tuberculosis/diagnosis; Mycobacterium/classification; DNA probes.

### Introdução

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, de caráter endêmico e de distribuição mundial.

O aparecimento da co-infecção tuberculose/HIV, o aumento de cepas multirresistentes de *M. tuberculosis* e de casos de doenças provocadas por micobactérias não-

\* Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional Santos, Santos (SP) Brasil.

1. Assistente de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica. Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional Santos, Santos (SP) Brasil.

2. Pesquisador Científico. Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional Santos, Santos (SP) Brasil.

3. Técnico de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica. Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional Santos, Santos (SP) Brasil.

4. Biologista. Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional Santos, Santos (SP) Brasil.

5. Biomédica. Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional Santos, Santos (SP) Brasil.

Endereço para correspondência. Andréa Gobetti Vieira Coelho. Rua Oswaldo Cruz, 67, apto. 94, Boqueirão, CEP 11045-101, Santos, SP, Brasil.

Tel 55 13 3232-5112. E-mail: dea\_gobetti@hotmail.com

Apoio financeiro: Nenhum.

Recebido para publicação em 1/2/2008. Aprovado, após revisão, em 9/4/2008.

tuberculosas (MNT) culminou no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos para obtenção de respostas mais rápidas no isolamento e na identificação do agente.

Nesse contexto, frente à morosidade das técnicas convencionais de identificação das micobactérias, os laboratórios de microbiologia necessitam constante atualização a fim de possibilitar maior rapidez na identificação do agente, o que vem sendo um desafio constante aos programas de controle da doença.

A biologia molecular mostra-se uma ferramenta útil no diagnóstico da tuberculose, pois possibilita estimar casos atribuídos à transmissão recente de *M. tuberculosis*,<sup>(1)</sup> identificar fatores de risco,<sup>(2)</sup> documentar a reinfeção exógena,<sup>(3)</sup> estudar padrões de resistência às drogas<sup>(4)</sup> e detectar diferenças fenotípicas—de forma rápida e com rendimento mais acurado que os métodos tradicionais.<sup>(5)</sup>

Estudos têm avaliado a utilização de sondas genéticas na identificação de micobactérias que crescem em meio sólido ou líquido, através da utilização de sondas genéticas associadas às técnicas de hibridação, como alternativa aos testes bioquímicos, uma vez que permite a identificação do complexo *M. tuberculosis*, complexo *M. avium*, *M. kansasii*, *M. intracellulare* e *M. gordonae*.<sup>(6,7)</sup>

O uso desse sistema em países com elevada prevalência da doença, porém com pouco recurso financeiro, deve ser avaliado em relação às técnicas convencionais e às relações custo-benefício envolvidas.<sup>(8)</sup>

Assim, na qualidade de laboratório de referência da Baixada Santista; região com alta incidência de tuberculose (104/100.000 habitantes)<sup>(9)</sup> e elevada incidência de formas de tuberculose multirresistente e de portadores da co-infecção tuberculose/HIV,<sup>(10)</sup> nosso objetivo para este estudo foi avaliar a metodologia de sondas genéticas, em nossa rotina laboratorial, pela análise comparativa da sensibilidade, especificidade e precocidade na identificação do complexo *M. tuberculosis* com os métodos fenotípicos clássicos.

## Métodos

Trata-se de uma análise retrospectiva dos dados de registros manuais (não informatizados) da rotina laboratorial das amostras biológicas encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) – Laboratório Regional

**Tabela 1** – Distribuição das 178 cepas analisadas, segundo os métodos de identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional Santos, 2002-2004.

Identificação técnica	Sonda genética	Método clássico
Complexo Mtb, n (%)	137 (77)	137 (77)
MNT, n (%)	41 (23)	41 (23)
Total, n (%)	178 (100)	178 (100)

Mtb: *M. tuberculosis*; e MNT: micobactéria não-tuberculosa.

Santos, de pacientes sintomáticos respiratórios ou com suspeita clínica de tuberculose pulmonar e/ou micobacterioses, atendidos nas Unidades Básicas de Saúde da Baixada Santista, segundo técnicas recomendadas pelo Ministério da Saúde (MS),<sup>(11)</sup> entre 2002 e 2004.

Foram incluídas todas as amostras processadas no período em estudo, com cultura positiva e teste de identificação concluída em ambas as metodologias de análise.

As amostras que apresentaram, nos exames laboratoriais, contaminação do material de cultura, bem como problemas técnicos que inviabilizaram a realização do teste de identificação, foram excluídas do estudo.

As fontes de dados utilizadas na pesquisa foram o IAL – Laboratório Regional Santos, cujas fontes são o *Livro de Registro de Baciloscopia e Cultura para Diagnóstico e Controle da Tuberculose e Ficha Laboratorial do Paciente*; assim como o IAL – Laboratório Central.

Os dados obtidos nos registros laboratoriais foram transportados e armazenados em um banco de dados específico, criado em programa Microsoft Excel para Windows 2000, versão XP, para agrupamento e análise comparativa entre as metodologias.

**Tabela 2** – Resultado comparativo entre sonda genética e métodos clássicos de identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, em 178 cepas analisadas. Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional Santos, 2002-2004.

Identificação	Sonda genética	Método clássico	
		Complexo Mtb	MNT
Complexo Mtb, n (%)	137 (77)	134 (75)	3 (2)
MNT, n (%)	41 (23)	3 (2)	38 (21)
Total, n (%)	178 (100)	137 (77)	41 (23)

Mtb: *M. tuberculosis*; e MNT: micobactéria não-tuberculosa.

As técnicas laboratoriais utilizadas foram as rotineiramente realizadas no diagnóstico da tuberculose, padronizadas conforme normas e recomendações do MS, descritas no *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*.<sup>(11)</sup>

O exame de baciloscopia foi realizado por meio da coloração de Ziehl-Nielsen, após o esfregaço de cada amostra coletada. Em lâminas positivas, foi realizada a contagem bacilar semiquantitativa conforme o índice baciloscópico recomendado pelo MS.<sup>(11)</sup>

As culturas positivas foram obtidas, conforme rotina do Laboratório Regional Santos, a partir do isolamento da micobactéria em meio Middlebrook 7H9 do sistema MB/BacT™ e em meio de Löwenstein-Jensen, após digestão e descontaminação pelo método de Petroff.<sup>(12)</sup>

Posteriormente, as micobactérias isoladas nos meios Middlebrook 7H9 do sistema MB/BacT™ e Löwenstein-Jensen foram identificadas concomitantemente pela metodologia molecular e pelos métodos bioquímicos clássicos.

A utilização do sistema de sonda genética AccuProbe® (Gen-Probe Inc., San Diego, CA, USA) foi realizada pelo IAL – Laboratório Regional Santos. Essa é uma metodologia molecular que emprega uma fita simples de DNA marcada com éter de acridina complementar ao rRNA do microorganismo alvo. Após a lise das células, o rRNA é liberado, e a sonda marcada se combina com o rRNA formando um complexo sonda mais rRNA. O complexo formado é detectado por quimioluminescência com um luminômetro, sendo a quantidade de luz produzida proporcional à quantidade de complexo sonda + rRNA presente na amostra.<sup>(6,11)</sup> Durante todo o procedimento, foram obedecidas criteriosamente as recomendações do fabricante.<sup>(13)</sup>

Os métodos bioquímicos clássicos utilizados na identificação das micobactérias foram realizados pelo IAL – Laboratório Central São Paulo e são baseados na análise das propriedades bioquímicas<sup>(13)</sup> e fenotípicas<sup>(11)</sup> das micobactérias.

A metodologia em estudo foi avaliada estatisticamente pelo cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. Foram realizados cálculos estatísticos para determinação dos valores de concordância entre as metodologias (kappa), assim como avaliados o tempo de identificação e de liberação do resultado em ambos os métodos.

**Tabela 3** – Distribuição anual das 178 cepas analisadas, segundo os métodos de identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional Santos, 2002-2004.

Ano	Métodos clássicos		Sonda genética	
	Complexo Mtb, n (%)	MNT, n (%)	Complexo Mtb, n (%)	MNT, n (%)
2002	77 (43)	18 (10)	77 (43)	18 (10)
2003	32 (18)	5 (3)	32 (18)	5 (3)
2004	28 (16)	18 (10)	28 (16)	18 (10)
Total	178 (100)		178 (100)	

Mtb: *M. tuberculosis*; MNT: micobactéria não tuberculosa.

## Resultados

Das 178 cepas analisadas, 134 (75%) apresentaram resultado positivo para o complexo *M. tuberculosis* através do sistema de sonda genética e métodos clássicos; 3 (2%) apresentaram resultado positivo para o complexo *M. tuberculosis* através do sistema de sonda genética e positivo para MNT pelos métodos clássicos; 3 (2%) apresentaram resultado negativo pelo sistema de sonda genética e positivo para o complexo *M. tuberculosis* pelos métodos clássicos; e 38 (21%) amostras mostraram-se negativas para complexo *M. tuberculosis* em ambos os métodos (Tabela 1).

Efetuando-se os cálculos estatísticos para os valores de concordância entre o sistema de sonda genética e os métodos clássicos, obteve-se 98% de concordância observada, 66% de concordância esperada e 94% de concordância ajustada (kappa). O sistema de sonda genética apresentou uma sensibilidade de 98%, uma especificidade de 93%, valor preditivo positivo de 98% e valor preditivo negativo de 93% (Tabela 2).



**Figura 1** – Sistema de sonda genética AccuProbe®. Fonte: Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional Santos.

Em 2002, ano de implantação do sistema de sonda genética, observou-se uma discordância de 3%, sendo esta nula nos demais anos, apresentando concordância ajustada de 90% (kappa) (Tabela 3).

## Discussão

Do total de cepas analisadas, a prevalência de espécies pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* no período de estudo (2002-2004) foi de 77%; portanto, a ágil identificação da espécie é importante no diagnóstico da doença.

A baciloscopia é indicada como o exame principal de diagnóstico da tuberculose, importante principalmente no rastreamento dos sintomáticos respiratórios.

Nos grandes centros urbanos, como é o caso da região da Baixada Santista, local de grande incidência e prevalência da tuberculose, existe a necessidade de recursos laboratoriais mais confiáveis e mais rápidos, que respondam a complicações como a co-infecção tuberculose/HIV, a resistência às drogas, a ocorrência de MNT, entre outros problemas.

Hoje, no Brasil, há uma tendência para a aceitação da utilização de modernas metodologias diagnósticas, e essas técnicas vêm sendo introduzidas de forma rápida e progressiva nas universidades, centros de referência e serviços privados. A necessidade e a possibilidade da implantação de recursos mais complexos nos serviços públicos devem ser observadas.

O laboratório de referência em tuberculose da Baixada Santista, IAL – Laboratório Regional Santos, utiliza o sistema de sonda genética na identificação de micobactérias do complexo *M. tuberculosis* desde 2002.

Assim, diante da impossibilidade de um estudo mais detalhado do custo-benefício dessa metodologia, por utilizar equipamento e insumos importados, este estudo avaliou o rendimento comparativo entre o sistema de sonda genética e os métodos clássicos, realizados no IAL – Laboratório Regional Santos e IAL – Laboratório Central, respectivamente.

O sistema de sonda genética, mesmo sendo mais caro do que os métodos bioquímicos clássicos, é mais rápido, com resultados em aproximadamente 3 h. Já os métodos clássicos levam em média de 28 a 30 dias para um resultado, além de necessitar de maior tempo dos funcionários, uso de estufas, vidrarias e preparo de meios. O protocolo laborato-

rial do sistema de sonda genética é muito simples, com a utilização de apenas três aparelhos e de reagentes prontos (Figura 1).

Os resultados observados neste estudo confirmaram a expectativa através dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo encontrados em nossa análise, que foram satisfatórios e bastante próximos aos já descritos na literatura.

Ao analisarmos o desempenho da sonda genética, observamos números semelhantes ao descritos por outros autores que, a partir de 2.727 isolados obtidos de cultivos realizados em MB/BacT™, comprovaram a sensibilidade e especificidade do sistema de sonda genética de 96,4% e 100%, respectivamente.<sup>(14)</sup>

O sistema de sonda genética foi recomendado no consenso nacional através das *II Diretrizes Brasileiras para Tuberculose* para laboratórios de referência, por ser um método simples, disponível no mercado e validado.<sup>(15)</sup>

Com os resultados dos valores preditivos positivo e negativo deste estudo, confirmamos o ressaltado na literatura quanto aos benefícios da técnica do sistema de sonda genética na identificação do complexo *M. tuberculosis*,<sup>(16)</sup> justificando sua implantação e uso rotineiro em laboratórios de referência, em associação com os métodos clássicos, em unidades com alta prevalência da doença e que atendam casos de tuberculose de alta complexidade. A metodologia é altamente específica, sensível, rápida e resolutive. Facilita o diagnóstico, permitindo uma intervenção clínica ágil.

## Referências

1. Borgdorff MW, Nagelkerke N, van Soolingen D, de Haas PE, Veen J, van Embden JD. Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993-1995 using DNA fingerprinting. *Am J Epidemiol.* 1998;147(2):187-95.
2. García-García M, Palacios-Martínez M, Ponce-de-León A, Jiménez-Corona ME, Jiménez-Corona A, Balandrano-Campos S, et al. The role of core groups in transmitting *Mycobacterium tuberculosis* in a high prevalence community in Southern Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4(1):12-7.
3. van Rie A, Warren R, Richardson M, Victor TC, Gie RP, Enarson DA, et al. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med.* 1999;341(16):1174-9.
4. Davies GR, Pillay M, Sturm AW, Wilkinson D. Emergence of multidrug-resistant tuberculosis in a community-based directly observed treatment programme in rural South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999;3(9):799-804.

5. Pinto Jr H, Bica CG, Palaci M, Dietze R, Basso LA, Santos DS. Using polymerase chain reaction with primers based on the plcB-plcC intergenic region to detect Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. *J Bras Pneumol.* 2007;33(4):437-42.
6. Mello FC, Fonseca-Costa J. The utility of molecular biology in the diagnosis of tuberculosis. *J Bras Pneumol.* 2005;31(3):188-90.
7. Tortoli E, Bartoloni A, Böttger EC, Emler S, Garzelli C, Magliano E, et al. Burden of unidentifiable mycobacteria in a reference laboratory. *J Clin Microbiol.* 2001;39(11):4058-65.
8. Kritski AL, Conde MB, Souza GR. Tuberculose: do ambulatório à enfermaria. São Paulo: Atheneu; 2000.
9. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo - Coordenadoria de Controle de Doenças - Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Tuberculose no Estado de São Paulo: Indicadores de Morbimortalidade e Indicadores de Desempenho. *Bol Epidemiol Paulista.* 2006;3(Supl 4):S1-37.
10. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo - Programa Estadual de DST/AIDS - Centro de Vigilância Epidemiológica. Tuberculose. *Bol Epidemiol Regional DIR XIX Baixada Santista.* 2005;5(1):7-10.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Combate da Tuberculose. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro: Fundação Nacional da Saúde, 2005.
12. Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
13. Kantor IN. Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal. Serie de monografías científicas y técnicas, 11/rev. 1. Buenos Aires: Centro Panamericano e Zoonosis, 1988.
14. Badak FZ, Goksel S, Sertoz R, Nafie B, Ermertcan S, Cavusoglu C, et al. Use of nucleic acid probes for identification of Mycobacterium tuberculosis directly from MB/BacT bottles. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1602-5.
15. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes brasileiras para tuberculose 2004. *J Bras Pneumol.* 2004;30(Supl 1):S2-S56.
16. Spada DT, Santos MA, Almeida EA, Augusto M, Albarral MI, Melo FA. Evaluation of a genetic probe (Gen-Probe Accuprobe® system) in comparison to traditional methods for identifying members of the Mycobacterium tuberculosis complex. *J Bras Pneumol.* 2005;31(3):219-24.