

Avaliação do desempenho da técnica de nested-PCR em amostras de sangue coletadas de pacientes pediátricos com suspeita de tuberculose em hospitais públicos do Recife/PE.

Lílian Maria Lapa Montenegro

Departamento de Imunologia
Laboratório de Imunoepidemiologia

CPqAM

Centro de Pesquisas
Aggeu Magalhães

Fundação Oswaldo Cruz
Ministério da Saúde



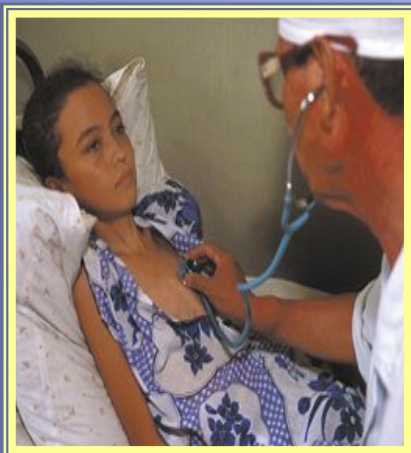
FIOCRUZ



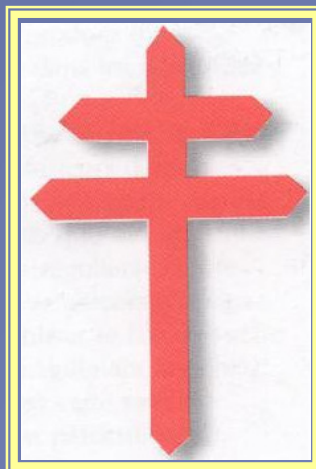
Ministério
da Saúde
Governo Federal

Introdução

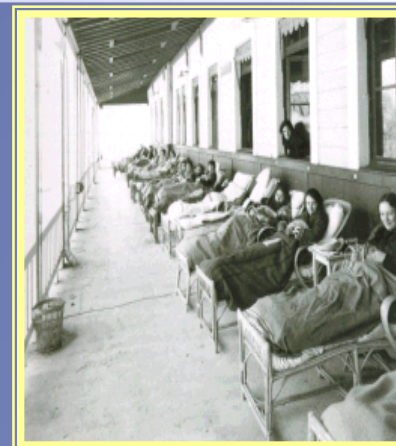
OMS: PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA



DIAGNÓSTICO



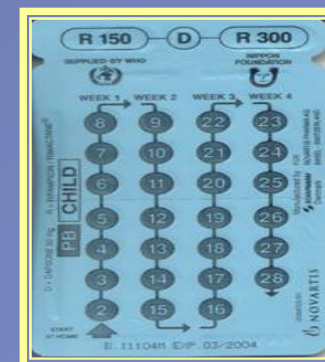
TUBERCULOSE



TRATAMENTO

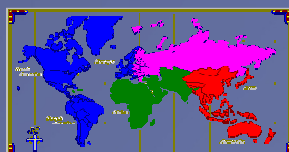


VACINAÇÃO BCG



QUIMIOPROFILAXIA

Situação Geral da Tuberculose



8 milhões de casos por ano, com cerca de 2 milhões de mortes, atingindo cerca de 1,5 milhão de crianças anualmente.



80 mil casos por ano (10% < 15 anos), com cerca de 5 mil mortes;

Foram notificados 5.286 casos, em 2006.



Recife é a capital brasileira com maior taxa de mortalidade específica. 184 casos novos de TB em crianças foram notificados, sendo 74,46% forma TB pulmonar.

Introdução

❖ Características da Doença em Crianças:

- ✓ Dados epidemiológicos escassos;
- ✓ Forma Pulmonar;
- ✓ Crianças (<2 anos) têm o dobro das taxas de adoecimento;
- ✓ Diagnóstico TB Infantil: transmissão recente;
- ✓ A obtenção do escarro é restrita pela dificuldade de expectoração, sobretudo em menores de seis anos de idade.

❖ Aumento da prevalência de casos de TB em < de 5 anos:

CASOS BACILÍFEROS EM ADULTOS

Falha no Programa de Controle da Tuberculose:

- ↑ Abandono ao tratamento anti-TB;
- ↑ HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida);
- ↑ Multirresistência.

Introdução

Diagnóstico de TB em crianças: conjunto de dados indiretos:

- ✓ História clínica;
- ✓ Achados radiológicos;
- ✓ História epidemiológica de contato com adulto tuberculoso;
- ✓ Interpretação de teste tuberculínico (vacinação BCG);
- ✓ Evolução terapêutica.

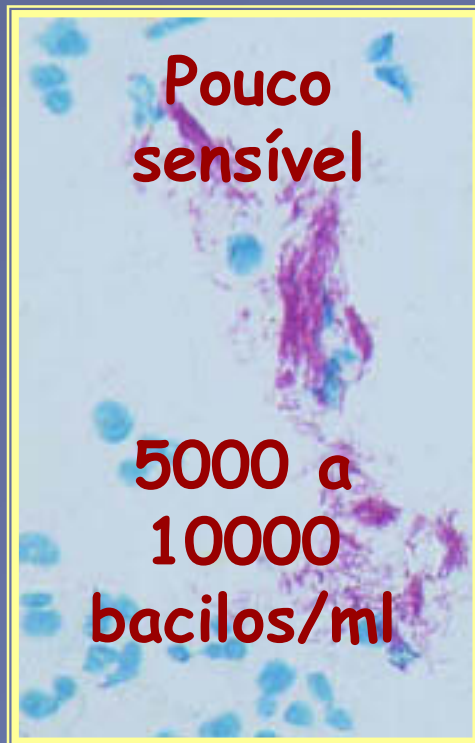
Dificuldade diagnóstica ⇒ formas paucibacilares:

- ✓ Tuberculose infantil;
- ✓ Tuberculose extrapulmonar;
- ✓ Tuberculose em HIV positivo;
- ✓ Tuberculose em pacientes imunodeprimidos.



Diagnóstico tradicional da tuberculose

O diagnóstico laboratorial tradicional da tuberculose apresentam limitações.



Baciloscopia



Cultura e identificação do *M. tuberculosis*

**Como melhorar a eficiência do Diagnóstico da Tuberculose em
 ≤ 15 anos ?**

NOVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO



Objetivo do estudo:

Avaliar o desempenho da técnica de reação em cadeia da polimerase (nested-PCR) em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos para ser utilizada como ferramenta diagnóstica auxiliar da tuberculose.



CASUÍSTICA

- Estudo do tipo série de casos, com pacientes de ambos os sexos, na faixa pediátrica com suspeita de tuberculose, provenientes do ambulatório e enfermaria dos principais Hospitais Públicos da rede SUS de Recife/Pernambuco, no período de janeiro de 2003 a agosto de 2005;
- O diagnóstico de tuberculose foi realizado pelo médico assistente do serviço de saúde de acordo com os critérios clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e resposta do paciente à terapêutica específica;
- O responsável pelo menor autorizou a participação na pesquisa, através da assinatura no termo de consentimento. As informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais de cada paciente foram registradas em uma ficha e depositadas em um banco de dados para as análises estatísticas;
- O projeto foi aprovado pelo comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM).

Metodologia



Os pacientes da pesquisa foram categorizados nos seguintes grupos:

Tuberculose doença (controle positivo): pacientes com quadro clínico e/ou radiológico compatível e isolamento do *M. tuberculosis* através de exame direto e/ou cultura ou apresentar resposta terapêutica positiva clínica a terapia específica (ATS, 2000);

Tuberculose infecção: sem manifestações clínicas e radiológicas da doença; exames bacteriológicos negativos; teste tuberculínico positivo ($\geq 10\text{mm}$ em crianças sem BCG ou $\geq 15\text{mm}$ naquelas vacinadas há mais de dois anos BCG, Funasa/MS - 2002) e história de contato com adulto portador de tuberculose ativa;

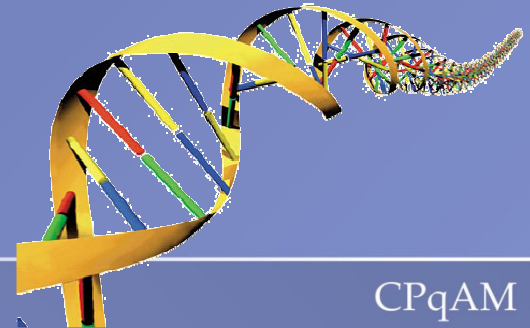
TB Descartada: histórico de contato com adulto tuberculoso, ausência de sinais e sintomas ou alterações sugestivas de TB e teste tuberculínico negativo.

Sem tuberculose (controle negativo): ausência de história de contágio com adulto tuberculoso, de manifestações clínicas e de achados laboratoriais compatíveis com TB.

Metodologia

Coleta e processamento do sangue:

- ❖ **Sangue:** 4,5 ml de sangue periférico de cada paciente usando tubos (Vacutainer®, Becton and Dickson, England) contendo EDTA;
- ❖ **Extração e purificação de DNA:** Rosseti, 1997;
- ❖ **Técnica de Nested-PCR:** Rodrigues, 1997; amplificam fragmentos de 123pb e 81pb
- ❖ **Alvo molecular:** Sequência de Inserção IS6110 - 6 a 20 cópias/genoma;
- ❖ **Análise dos produtos amplificados:** eletroforese em gel de agarose a 2,5%, corado com brometo de etídio e visualizados em UV.



Metodologia

Análise Estatística

- Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos;
- Análise das variáveis: foi aplicado o teste Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher quando necessário;
- Validação dos testes: foram calculados a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo com seus respectivos intervalos de confiança. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.
- Softwares Utilizados: EpiInfo 6.04d e o SPSS 8.0.

**Resultados/
Discussão**

Características	N	%
Idade		
<= 5 anos	48	39,7
> 5 anos	72	60,2
Procedência		
Ambulatório	100	87,5
Enfermaria	15	12,5
Sexo		
Masculino	61	50,5
Feminino	59	49,5
Diagnostico final		
TB doença	42	35
TB infecção	23	19,2
Controles ¹	55	45,8
Forma clínica		
TB Pulmonar	33	79
TB Extrapulmonar	9	21

¹ TB descartada (40) + Sem TB (15)

Tabela 1 – Características clínicas e demográficas dos pacientes estudados

Resultados/Discussão

Resultados da NPCR	Tuberculose		Tuberculose		Forma Clínica	
	Doença	Controles	Infecção	Controles	Pulmonar	Extra-pulmonar
Positivo	11 (26,2%)	4 (7,3%)	6 (26,1%)	4 (7,3%)	6 (18,2%)	5 (55,5%)
Negativo	31 (73,8%)	51 (92,7%)	17 (73,9%)	51 (92,7%)	27 (81,8%)	4 (44,5%)
Sensibilidade (IC 95%)	26,2% (14,4% - 42,3%)		26,1% (11,1% - 48,7%)		18,2% (7,6% - 36,1%)	
Especificidade (IC 95%)	92,7% (81,6% - 97,6%)		92,7% (81,6% - 97,6%)		44,4% (15,3% - 77,3%)	
VPP (IC 95%)	73,3% (44,8% - 91,1%)		60% (27,4% - 86,3%)		54,5% (24,6% - 81,9%)	
VPN (IC 95%)	62,2% (50,8% - 72,5%)		75% (62,8% - 84,4%)		12,9% (4,2% - 30,8%)	
Valor de p	0,01		0,033		0,038	

Tabela 2 - Desempenho da NPCR nos pacientes com TB doença, TB infecção, controles e forma clínica

Conclusões

- A amplificação do DNA por PCR demonstrou ser um método bastante específico e com uma sensibilidade razoável para detecção do *M. tuberculosis em sangue total em comparação a outros trabalhos*;
- Métodos baseados na amplificação de DNA poderão auxiliar o diagnóstico precoce de crianças e indivíduos paucibacilares e reduzir o período para definição da doença de algumas semanas para um a dois dias;
- Pode-se sugerir a NPCR como método auxiliar para confirmação da TB infantil naqueles casos inicialmente suspeitos, cujo resultado foi positivo associado à presença de critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (RX de tórax e teste tuberculínico). Porém, quando negativa pode ser considerada como provável método de exclusão da doença (especificidade de 92,73%), porém, devido aos pacientes serem paucibacilares e o tipo de amostra ter alto grau de inibição da PCR, seu resultado não pode ser analisado sem associação com o quadro clínico.

Conclusões

- A detecção de DNA do *M. tuberculosis* em sangue periférico pode ser utilizada como ferramenta auxiliar para o rápido diagnóstico das formas disseminadas de TB e extrapulmonares;
- Por conta da imprecisão em identificar crianças infectadas ou doentes, da pouca atenção dada à TB infantil nos programas de governo e da escassez de estudos na literatura com técnicas moleculares para a detecção do bacilo, torna-se fundamental a realização de pesquisas sobre a TB na forma paucibacilar. E ainda de novas abordagens diagnósticas, mais sensíveis e específicas, em diferentes espécimes biológicas. Diante deste estudo, sugere-se a realização de mais pesquisas utilizando testes moleculares para diagnóstico da TB paucibacilar em sangue com uma amostra representativa da população.

EQUIPE



**Financiamento: CPqAM/FIOCRUZ; FACEPE;
PDTIS/FIOCRUZ**

Contato: lilian@cpqam.fiocruz.br

**“...a saúde é a chave da prosperidade;
as boas condições de saúde levam ao
crescimento econômico, enquanto que
as más conduzem à pobreza.”**

Nações Unidas.