



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA GERAL DE PESQUISA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bloco 06 – Bairro Ininga
CEP: 64049-550 – Teresina-PI – Brasil – Fone (86) 3215-5564 – Fone/Fax (86) 3215-5560
E-mail: pesquisa@ufpi.br, pesquisa@ufpi.edu.br

Resumo Projeto

Acurácia Diagnóstica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR-RT) para Tuberculose Meningite (TBM).

Vivianne Saraiva Leitão Viana (ICV/CNPq), Camila Cunha de Abreu (UFPI), Dilson Marreiros Nunes Filho (UFPI), Regina Silva Rabelo (ICV/CNPq), Carlos Henrique Nery Costa (Orientador, Centro de ciências da Saúde –UFPI)

Palavras-chave: Tuberculose, Real Time PCR.

Introdução

A tuberculose (TB) é um problema de saúde pública de importância global, pois é a maior causa de morbidade e mortalidade. Com a alta prevalência da infecção por HIV, as formas disseminadas e extrapulmonares da tuberculose estão aumentando consideravelmente.

A Tuberculose Meningite (TBM) é a forma mais grave e fatal que, quando não leva o doente a óbito, provoca seqüelas como diminuição da capacidade intelectual, doenças psiquiátricas, convulsões recorrentes, distúrbios visuais e motoras e surdez (GUALBERTO, 2009).

Os testes convencionais são frequentemente inúteis no diagnóstico dessa patologia desde que a TBM é uma forma paucibacilar de TB (PAI *et al.*, 2003). Assim, a amplificação e detecção do DNA do *M. tuberculosis* no LCR, através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), tem emergido com o objetivo de habilitar os clínicos a fazerem o diagnóstico rápido e acurado (KOX, 1995).

Baseado nisso, este estudo visa à análise da acurácia do diagnóstico rápido da RT-PCR para TBM, com o intuito de melhorar o prognóstico da doença, permitindo a introdução precoce do tratamento e diminuindo o índice de óbito e seqüelas neurológicas.

Metodologia

Estudo experimental laboratorial. População alvo: população pertencente à região nordeste. População fonte: oriunda do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela (IDTNP). População em estudo: pacientes identificados com meningite crônica. Critério de inclusão: pacientes diagnosticados com meningite crônica e que assinaram previamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Critério de exclusão: alíquota de líquido insuficiente.

Metodologia detalhada: os pacientes identificados com meningite crônica serão submetidos à coleta do LCR para exame quimiocitológico no IDTNP. Uma alíquota do LCR coletado será submetida à coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) no laboratório de Bacteriologia do IDTNP. Realizar-se-á também a RT-PCR. O primeiro passo do processo de extração do DNA consistirá na centrifugação do LCR por 15 minutos a 8.000g a 4°C em uma adaptação do processo de centrifugação realizado antes da sementeira em meios de cultura para micobactérias. Após esse procedimento, 500 µL do LCR precipitado será submetido à extração e purificação do DNA através de colunas Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit®; 28 Qiagen, Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante com seguintes modificações: (i) 500 µL de LCR foram misturados com 50 µL de solução de lisozima (200mg/mL) e 50 µL de solução de mutanolisina (375U/mL). Após um período de incubação a 37 °C por 2 horas, o protocolo original da Qiagen® será seguido resultando em 50 µL de DNA extraído, que será mantido a – 20 °C até o momento do uso. As reações de PCR em tempo real serão realizadas utilizando-se TaqMan® Universal Master Mix Kit (Applied Biosystems®) de acordo com instruções do fabricante, em uma mistura com volume total de 25µL contendo 5µL de DNA extraído, 300nM de cada *primer* e 100nM da sonda. Para a amplificação será utilizado o ciclo universal do aparelho 7.300 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems®) composto por 50°C por 2 minutos (eliminação de contaminantes pela ação da Amperase-UNG), 95°C por 10 minutos (inativação da amperase, desnaturação do DNA molde, ativação da Taq polimerase), uma seqüência de 45 ciclos, cada um deles consistindo em reações a 95°C por 15 segundos para desnaturação do DNA molde, 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão das fitas). Os dados serão coletados na fase de extensão (60°C por 1 minuto). A análise dos dados serão realizadas pelo software da máquina (7300 SDS Systems-Applied Biosystems®), serão consideradas positivas as amostras que apresentaram curvas de amplificação e multicomponente características, com *Cycle Threshold* (Ct) ≤ 38 (Gualberto, 2009).

Amostra: a amostra compreenderá aqueles pacientes diagnosticados com meningite crônica. De acordo com detalhada análise do livro de diagnósticos do IDTNP, identificou-se uma média de quatro pacientes diagnosticados com TBM por ano. A partir daí, fez-se uma aproximação de quatro amostras por mês que serão submetidas à RT-PCR. Contando com as possibilidades de se realizar RT-PCR inapropriadas, elevou-se o número de amostras realizadas para 150 por ano.

Método de análise: programa estatístico STATA.

Considerações éticas: vale ressaltar que os riscos à população serão considerados mínimos. Além disso, todos os dados relacionados à população em estudo serão confidenciais e privados.

Resultados e Discussão

Quarenta pacientes internados no IDTNP durante o período de padronização do plano de trabalho preencheram os critérios de inclusão e foram analisados no projeto.

Vinte e seis (65%) pacientes eram do sexo masculino. A mediana da idade foi de 23 anos, com uma variação de 1 a 69 anos.

Onze (27,5%) pacientes possuíam idade maior ou igual a 36 anos.

Cinco (12,5%) pacientes possuíam contagem de células brancas sanguíneas maior ou igual a $15.000 \times 10^3 / \text{mL}$.

Vinte e um (52,5%) pacientes possuíam história da doença maior ou igual há 06 dias.

Nove (22,5%) pacientes possuíam contagem de células brancas do LCR maior ou igual há $900 \times 10^3 / \text{mL}$.

Nove (22,5%) pacientes possuíam uma neutrófilos do LCR maior ou igual a 75%.

O diagnóstico de TBM em adultos é difícil com quaisquer que sejam os recursos disponíveis para o médico. Um apoio diagnóstico clínico ou laboratorial para TBM deve ser

sensível. Uma regra de diagnóstico clínico ou árvore de classificação para a TBM pode melhorar a sensibilidade dos métodos laboratoriais atuais, e pode ser utilizado em ambientes com pouco suporte de diagnóstico microbiológico, ou seja, onde a TBM é mais comum.

Pacientes com TBM presente e uma história da doença maior são mais propensos a ter paralisia de nervos cranianos, eles geralmente não possuem leucocitose sanguínea, e seu LCR será frequentemente claro, com moderado número de linfócitos e neutrófilos. No entanto, diagnóstico de incerteza frequentemente persiste apesar do primeiro LCR analisado. Sendo assim, esse esquema diagnóstico é utilizado comparativamente à Real Time PCR.

Referências Bibliográficas

BHIGJEE, A. I. *et al.* Diagnosis of tuberculous meningitis: clinical and laboratory parameters. **International Journal Infectious Diseases**, vol. 11, nº 4, p. 348-54. 2007.

GUALBERTO, F.A.S. Valor diagnóstico da PCR em tempo real na meningite tuberculosa. 1 ed. São Paulo: **Instituto de Infectologia Emílio Ribas**, 2009. 68 p.

PAI M. *et al.* Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification test for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infectious Diseases**, vol. 3, p. 633-43. 2003.

THWAITES, G.E. *et al.* Diagnosis of adult tuberculous meningitis by use of clinical and laboratory features. **The Lancet**, vol. 360, p. 1287-92. 2002