

Importância do diagnóstico laboratorial na busca de casos de tuberculose em um hospital psiquiátrico

Searching tuberculosis cases in a psychiatric hospital: importance of laboratory diagnosis

RIALA6/1049

Hindenburg C. G. da COSTA^{1,2}; Ana Carolina MALASPINA¹; Fernando F. de MELLO³; Clarice Q. F. LEITE^{1*}

* Endereço para correspondência: Rodovia Araraquara-Jaú Km 01 CEP 14801-902 Araraquara-SP e-mail leitecqf@fcar.unesp.br

¹ Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara-SP

² Laboratório Hormonal, Rio Verde-GO.

³ Ambulatório Clemente Ferreira, São Paulo-SP

Recebido: 19/08/2004 – Aceito para publicação: 09/09/2005

RESUMO

Durante o período de fevereiro a agosto de 2002, a pesquisa de *M. tuberculosis* foi realizada entre 74 internos de um Hospital Psiquiátrico no interior do Estado de Goiás - Brasil. Micobactérias foram isoladas de cinco (6,8 %) dos pacientes analisados, sendo identificados quatro *Mycobacterium tuberculosis* e um *Mycobacterium chelonae*. A baciloscopia foi positiva apenas para a amostra de escarro contendo *M. chelonae*. O cultivo possibilitou o isolamento de *M. tuberculosis* a partir de espécimes clínicos de quatro pacientes com baciloscopia negativa. As micobactérias foram identificadas por meio de metodologia clássica, análise de ácidos micólicos e biologia molecular (PCR). A técnica de PCR, por tratar-se de um método mais sensível e específico, detectou *M. tuberculosis* em uma cultura em que apenas *M. chelonae* foi identificado por meio de técnicas convencionais. Os quatro isolados de *M. tuberculosis* foram sensíveis a isoniazida e rifampicina no método das proporções de sensibilidade as drogas, empregado neste trabalho.

Palavras-Chave. hospital psiquiátrico, reação da polimerase em cadeia, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium chelonae*, ácidos micólicos, sensibilidade a drogas.

ABSTRACT

From February to August of 2002, the search for *M. tuberculosis* was performed among 74 inpatients from the Psychiatric Hospital of Goiás - Brazil. Mycobacteria were isolated from five (6.8%) patients, being four *M. tuberculosis* isolates and one *M. chelonae*. *M. chelonae* positive result on bacilloscopy was observed in a sputum sample only. *M. tuberculosis* was isolated culture of clinical specimens from four smear-negative patients. Mycobacteria species were identified by means of conventional methods, mycolic acids analysis, and PCR technique. The most specific and sensitive method - PCR detected *M. tuberculosis* on a culture and *M. chelonae* was only identified by means of conventional methods. According to drug susceptibility profiles, all of four *M. tuberculosis* isolates were susceptible to isoniazid and riphampicin.

Key Words. psychiatric hospital, polymerase chain reaction technique, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium chelonae*, mycolic acids, drug sensibility.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é a causa mais comum de morte infecciosa em adultos no mundo¹. No Brasil são registrados cerca de 129.000 casos novos e aproximadamente 7.000 óbitos por ano². O alto índice de tuberculose no Brasil decorre das deficiências da rede de saúde pública, das dificuldades para diagnosticar a doença ou até mesmo de identificar os enfermos que não procuram ou estão impossibilitados de procurar os postos de saúde. Dentre estes últimos, de acordo com Voahangy et al.³, a prevalência da tuberculose em pacientes enclausurados é 16 vezes maior do que na população em geral, sugerindo que a taxa de transmissão é alta nesses ambientes. Lourenço et al.⁴ verificaram alta taxa de resistência a drogas (17,2 %) entre 58 amostras de *M. tuberculosis* isolados do Sanatório Penal Masculino do Rio de Janeiro.

A confirmação do diagnóstico da tuberculose faz-se através da visualização do bacilo álcool-ácido resistente na baciloscopia e do cultivo do microrganismo em meios seletivos a partir de materiais biológicos. A técnica de cultura é uma metodologia mais sensível do que a baciloscopia, fornecendo resultados positivos com apenas 10 a 100 bacilos por mL de escarro. Para o cultivo através do método de Petroff⁵, inicialmente é feita a descontaminação do escarro empregando solução de hidróxido de sódio a 4% e o material descontaminado é cultivado em meio Lowestein-Jensen (LJ). Kudoh e Kudoh⁶ propuseram uma técnica simplificada que permite a descontaminação da amostra de escarro em *swab* de algodão apenas com sua imersão em solução de hidróxido de sódio a 4%, seguido de semeadura em meio de cultura de Ogawa.

A identificação das espécies de micobactérias é então realizada através da verificação da capacidade do microrganismo em crescer no meio LJ contendo inibidores como o ácido *p*-nitrobenzóico (PNB) e tiocemicarbazona (THC) e através de provas bioquímicas como a produção das enzimas catalase, nitrato redutase e niacina⁵. A identificação clássica é demorada, levando cerca de duas semanas, uma vez que vários destes testes requerem a visualização do aparecimento de colônias, sendo também fastidiosa, exigindo a preparação de meios complexos⁵. Com o objetivo de agilizar a identificação das micobactérias, diversos métodos alternativos para detecção do bacilo da tuberculose ou parte de seus componentes têm sido propostos, tais como: métodos químicos e de biologia molecular.

Dentre os métodos químicos, a análise de ácidos micólicos usando a técnica de cromatografia em camada delgada tem sido empregada com bastante sucesso na identificação das micobactérias⁷. A cromatografia em camada delgada e outros sistemas para cromatografia de lipídeos da parede celular são técnicas rápidas de identificação das espécies de micobactérias. Leite et al.⁷ recomendam a sua utilização principalmente na identificação de culturas mistas.

Como método de biologia molecular, a técnica de PCR tem sido amplamente utilizada para identificação de micobactérias⁸. Esta técnica amplifica seqüências específicas

do DNA cromossômico denominadas de seqüência alvo. As seqüências repetitivas, denominadas de segmentos de inserção (IS), têm sido pesquisadas e o segmento IS6110 é uma das seqüências mais exploradas para o diagnóstico de doenças causadas por *M. tuberculosis*⁹.

Em relação ao tratamento da tuberculose, desde o final da década de 70, o arsenal terapêutico disponível passou a ser constituído por cinco drogas principais: estreptomina (S), isoniazida (I), rifampicina (R), etambutol (E) e pirazinamida (P)⁴. Para se determinar o perfil de sensibilidade do *M. tuberculosis* frente a estas drogas, o método das proporções é considerado o método de eleição em toda a América Latina. Este método consiste em se estabelecer a proporção de mutantes resistentes às diferentes drogas em uma cepa de *M. tuberculosis*⁵.

Em vista do exposto, este trabalho teve como objetivo diagnosticar entre os pacientes internos de um hospital psiquiátrico casos de tuberculose e de outras micobacterioses através de métodos clássicos, análise de ácidos micólicos e técnica de PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Material analisado

Durante o período de fevereiro a agosto de 2002, três amostras de escarro matinais obtidos espontaneamente foram coletadas de cada um dos 74 pacientes internos (39 mulheres e 35 homens), totalizando 222 amostras. O estudo foi acompanhado por um corpo clínico especializado em clínica geral, sendo todos os pacientes submetidos a exames clínicos e radiológicos.

Quanto ao aspecto ético, o estudo teve aprovação do Comitê de Ética do referido hospital no ano de 2002.

Baciloscopia e cultivo

Para a baciloscopia, foram coletados porções purulentas de escarro e preparado dois esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen⁵.

O volume restante dos materiais foi destinado ao cultivo pela técnica de Kudoh e Kudoh⁶. Para tal, com o auxílio de *swabs*, retirou-se parte da porção mais densa ou purulenta do material, que foi mergulhada em um tubo contendo solução de hidróxido de sódio a 4% e deixado em contato por 2 a 3 minutos. Em seguida, o material descontaminado foi semeado sobre a superfície do meio sólido inclinado de Ogawa. Os tubos inclinados foram acondicionados em estufa a 37°C e mantidos por 60 dias, fazendo-se observações no 2º, 7º, 12º, 24º, 30º, 40º e 60º dia de incubação. As colônias com características compatíveis com a de micobactérias foram cultivadas em novos tubos de Ogawa para identificação posterior.

Identificação

As bactérias foram analisadas quanto às propriedades de álcool-ácido-resistência, aspectos fisiológicos (temperatura e velocidade de crescimento) e bioquímicos (nitrato, aril-

sulfatase e urease)⁵. A identificação química foi realizada através da análise de ácidos micólicos⁷. Paralelamente, foi feita a confirmação do complexo *M. tuberculosis* através da técnica de PCR segundo Eisenach et al.⁹.

Em linhas gerais, para a análise de ácidos micólicos, uma a seis alçadas de bactérias foram emulsionadas em dois mililitros de metoxietano com KOH a 40%, e a suspensão foi aquecida a 110°C por duas horas. Após a extração em 10 mL de éter etílico, os ácidos micólicos foram submetidos à secagem em banho-maria e metilados com diazometano. Para a realização do cromatograma, pequenas alíquotas dos ácidos micólicos foram depositadas sobre duas placas de sílica gel G60 e desenvolvidas em uma mistura de éter etílico-éter de petróleo (1:9) e outra de diclorometano. As placas foram então reveladas com solução de rodamina B a 0,01%.

Para identificação do *M. tuberculosis* usando a técnica de PCR empregou-se os *primers* INS1 (5' - CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC - 3') e INS2 (5' - GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA - 3') que originam um produto de amplificação de 245 pares de bases⁹. Para um volume final de 25 µL, foram empregadas as seguintes concentrações de reagentes: 14,97 µL de água milli Q, 2,5 µL de tampão para PCR 10X, 4,0 µL da mistura de dNTPs, 0,6 µL de cada *primer* na concentração de 5 µM, 1,0 µL de DNA proveniente de lisado bacteriano e 0,125 µL da enzima Taq polimerase. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: 95°C por 5 min, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 10 minutos. Após a eletroforese em gel de agarose a 1 %, o produto amplificado foi visualizado com o auxílio de transiluminador ultravioleta e foto-documentado.

Prova de sensibilidade as drogas

Os perfis de sensibilidade a rifampicina (R) e isoniazida (I) foram determinados através do Método das Proporções⁵. Para tal, 200 µL das suspensões bacilares (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶) foram semeadas nos meios LJ com e sem antibióticos. Os tubos foram incubados a 37°C por 28 dias e determinou-se a porcentagem de resistência através da contagem de colônias nos tubos controles e nos tubos testes.

RESULTADOS

As micobactérias foram isoladas de cinco (6,8 %) pacientes, sendo identificados quatro *M. tuberculosis* e um *M. chelonae*. De todos os pacientes foi possível obter escarros com piócitos, entretanto, nenhum deles apresentou exame radiológico e quadro clínico compatíveis com tuberculose (emagrecimento, tosse por mais de três semanas ou hemoptise).

Em relação ao diagnóstico laboratorial, a baciloscopia foi positiva para um único paciente (do qual isolou-se *M. chelonae*) e cinco pacientes apresentaram cultura positiva. Espécimes clínicos de quatro pacientes com baciloscopia negativa forneceram culturas positivas para *M. tuberculosis*. A

única micobactéria atípica encontrada, *M. chelonae*, foi isolada de uma mulher. Apesar da ocorrência de maior número de pacientes femininos na instituição, todos os casos de tuberculose observados foram em pacientes do sexo masculino. Na identificação, os cinco isolados apresentaram resultados compatíveis com as cepas de referência *M. tuberculosis* H37Rv e *M. chelonae* NCTC 946. As quatro amostras de *M. tuberculosis* não cresceram em meio LJ com ácido *p*-nitrobenzóico (PNB), sendo inibidos por esta droga. A cepa de *M. chelonae* cresceu amplamente no referido meio, em menos de 12 dias de incubação. Na prova para determinar o tempo de crescimento, foram verificadas colônias visíveis de *M. chelonae* em sete dias e colônias de *M. tuberculosis* em 36 dias. Todos os isolados de *M. tuberculosis* foram positivos para as provas bioquímicas de nitrato-redutase e urease, sendo negativos para arilsulfatase. O isolado de *M. chelonae* apresentou resultado negativo para as duas primeiras provas, no entanto foi positivo para a prova da arilsulfatase.

Em relação à análise de ácidos micólicos, todos os isolados apresentaram perfis de ácidos micólicos compatíveis com os das cepas de referência sendo I, III e IV para *M. tuberculosis* e I e II para *M. chelonae*.

Os resultados da reação de PCR são apresentados na Figura 1. O produto de amplificação de 245 pb, compatível com a cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv, foi verificado em todos os quatro isolados (amostras 1, 2, 3 e 5) identificados como *M. tuberculosis*. Uma amplificação tênue correspondente a fragmentos de 245 pb também foi detectada na amostra previamente identificada como de *M. chelonae* através da metodologia clássica e análise de ácidos micólicos. Com relação à sensibilidade das amostras, todas as micobactérias do

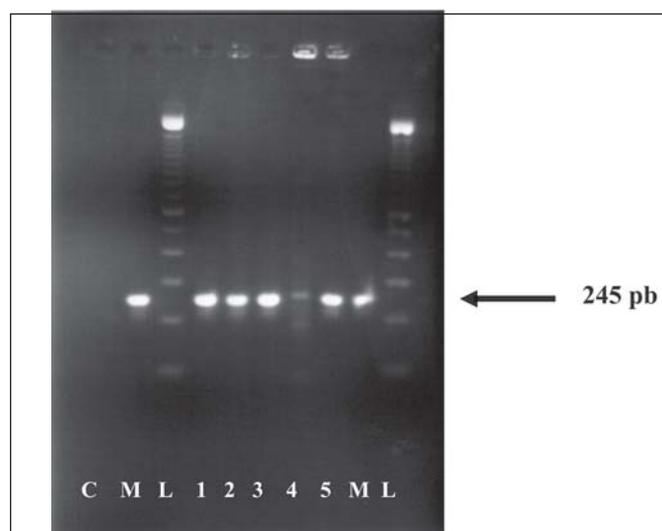


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose para *M. tuberculosis*. Linhas: C - controle negativo; M - *M. tuberculosis* H37Rv; L - marcador de peso molecular 100 pb; 1, 2, 3 e 5 - *M. tuberculosis* proveniente de pacientes, 4 - *M. chelonae* de paciente.

complexo *M. tuberculosis* foram sensíveis às drogas testadas (I e R), enquanto que o isolado de *M. chelonae* foi resistente.

DISCUSSÃO

De acordo com as fichas de notificações, dos 74 internos no Hospital Psiquiátrico, 51,3% eram do sexo feminino e 47,2% do sexo masculino, não sendo constatado nenhum caso de uso de drogas ilícitas ou de imunodebilidade por AIDS.

Nossos estudos mostraram que a espécie de micobactéria mais freqüente no hospital psiquiátrico foi o *M. tuberculosis*, com quatro isolados, sendo encontrada apenas uma cepa de *M. chelonae*. O isolamento de *M. chelonae* ocorreu em uma paciente que fazia tratamento para alcoolismo.

A incidência de isolamento de MOTT tem aumentado no mundo desde o advento da epidemia da AIDS^{10,11}, sendo detectadas também como agentes oportunistas em indivíduos não aidéticos³. Neste sentido, uma micobacteriose poderia ser justificável devido à dependência ao álcool. Entretanto em culturas realizadas posteriormente, *M. chelonae* não foi mais isolada desta paciente.

Com relação ao *M. tuberculosis*, esta foi recuperada por cultivo a partir dos espécimes clínicos negativos na microscopia, indicando maior sensibilidade da primeira técnica em relação a baciloscopia. Devido à complexidade do manuseio do espécime clínico e da necessidade de centrifugação, o cultivo tradicional é realizado apenas nos laboratórios de referência⁵. Por outro lado, o método proposto por Kudoh e Kudoh⁶, que é de fácil execução, possibilitou, neste trabalho, a detecção de casos paucibacilares. O cultivo possibilitou ainda a identificação das espécies através de métodos bioquímicos, análise de ácidos micólicos e PCR, assim como permitiu a avaliação do perfil de sensibilidade às drogas das cepas isoladas.

Em relação à identificação das espécies, os resultados mostraram que as metodologias foram compatíveis entre si. As quatro amostras que foram identificadas como sendo de *M. tuberculosis* pelas provas bioquímicas obtiveram resultados confirmatórios com a análise de ácidos micólicos (I, III e IV) e a amplificação do fragmento de 245 pb (Figura 1) pela técnica molecular. A cepa de *M. chelonae* identificada bioquimicamente apresentou, na análise de ácidos micólicos, perfil I e II, compatível com a cepa de referência. Entretanto na técnica de PCR, a amostra de *M. chelonae* apresentou um fragmento vestigial de 245 pb (Figura 1), sugerindo uma cultura mista de *M. chelonae* e *M. tuberculosis*. Tanaka et al.⁸ também detectaram, através de técnicas moleculares, uma cultura mista de *M. chelonae* e *M. tuberculosis* em um paciente de 71 anos que foi a óbito. A técnica de PCR, por se tratar de um método mais sensível e específico, detectou a presença de *M. tuberculosis* mesmo na cultura onde o crescimento de *M. chelonae* sobrepujou o crescimento desta micobactéria, uma vez que *M. chelonae* apresenta crescimento rápido. Alguns autores constataram que a técnica de PCR detecta um fentograma de DNA purificado, equivalente à quinta parte

do microrganismo. Entretanto, em espécimes clínicos como o escarro o limite de detecção tem variado de 100 a 1000 bactérias¹².

Em relação à transmissão intra-hospitalar da tuberculose, segundo Reicheler et al.¹³, fatores como escarros com baciloscopia positiva e radiografia de tuberculose cavitária são importantes na infecciosidade dos pacientes. Neste sentido, os resultados de baciloscopia negativa entre os pacientes com tuberculose, associado ao resultado do exame radiológico indicativo de um pulmão normal, sugere que os pacientes, no momento estudado, tinham pouco comprometimento pulmonar e que eram paucibacilares, com pouca probabilidade de serem transmissores. Entretanto, foi verificado, no hospital, alta incidência de doentes (04 em 74 internos) enquanto a incidência no Brasil é de 47,2/100.000 habitantes¹⁴ e na cidade de Rio Verde de 26/100.000 habitantes¹⁵. Este fato poderia ser justificado pelas condições especiais a que estão sujeitos os pacientes, como a existência de doenças associadas e o confinamento¹⁶, que podem predispor a reativação de uma tuberculose latente e sua disseminação. Por outro lado, dados de literatura mostram que bacilos resistentes a drogas múltiplas (TBMR) freqüentemente estão envolvidos em surtos de tuberculose institucional¹⁷. Taxas elevadas de TBMR primária foram identificadas em hospitais de Buenos Aires (25%), Rio de Janeiro (7%) e Florianópolis (20%)¹⁸. Neste sentido, a sensibilidade das cepas de *M. tuberculosis* aos antimicrobianos testados (I e R) sugere a sua origem na reativação de uma infecção latente, e não em infecção exógena recente.

Os resultados deste estudo indicam a necessidade de um monitoramento constante dos pacientes internos, possibilitando a detecção precoce dos casos de tuberculose e o tratamento adequado, evitando assim a transmissão da doença. Neste sentido, o cultivo das amostras de escarro através da técnica de Kudoh e Kudoh é de grande interesse pela simplicidade da metodologia, sendo o seu emprego recomendável nas instituições com características semelhantes à instituição estudada.

Como fruto deste estudo, os pacientes com tuberculose (inclusive a paciente da qual se isolou *M. chelonae*) foram tratados e todos os demais submetidos ao teste tuberculínico. A direção da instituição também estuda a possibilidade de realizar teste tuberculínico na admissão dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global Epidemiology of Tuberculosis: Morbidity and Mortality of a Worldwide Epidemic. *JAMA* 1995; 273: 220-6.
2. CNPq. Cientistas declaram guerra à tuberculose. CNPq notícias [citado em 2 out 2002]. Disponível em: URL: <http://www.cnpq.br/noticias/130902.htm>
3. Rasolofo-Razanamparany V, Menard D, Ratsitorahina M, Auregan G, Gicquel B, Chanteau S. Transmission of tuberculosis in the prison of Antananarivo (Madagascar), *Res Microbiol* 2000, 151: 785-95.
4. Lourenço MCS, Silva MO, Fonseca LS Multidrug-resistant tuberculosis among inmates in Rio de Janeiro, Brazil. *J Microbiol* 2000, 31: 17-9.

5. Brasil. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2nd ed., 1994.
6. Kudoh S, Kudoh M. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull WHO* 1974, 52: 71-82.
7. Leite CQF, Souza CWO, Leite SRA. Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998, 93: 801-5.
8. Tanaka II, Anno IS, Leite SRA, Cooksey RC, Leite CQF. Comparison of a multiplex-PCR with mycolic acids analysis and conventional methods for identification of mycobacteria. *Microbiol Immunol* 2003, 47: 307-12.
9. Eisenach KD. PCR amplification of a repetitive DNA sequence specific for *M. tuberculosis*. *J Clin Dis* 1990, 161: 977-81.
10. Shih JY, Hsueh PR, Lee LN, Wang HC, Yang PC, Kuo SH et al. Non tuberculous mycobacteria isolates, clinical significance and disease spectrum. *J Formos Med Assoc* 1997, 96: 621-7.
11. Tartaglione T. Treatment of nontuberculous mycobacterial infections: role of clarithromycin and azithromycin. *Clin Ther* 1997, 19: 626-38.
12. Jonas V, Alden MJ, Curry JI, Kamisango K, Knott CA, Lankford R et al. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1993, 31: 2410-16.
13. Reichler MR, Reves R, Bur S, Thompson V, Mangura BT, Ford J et al. Evaluation of investigations conducted to detect and prevent transmission of tuberculosis. *JAMA* 2002, 27: 992-5.
14. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Divisão de Vigilância Epidemiológica. Coordenação de Doenças Endêmicas. Área Técnica de Pneumologia Sanitária. Documento de indicadores e metas para o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, 2004.
15. Secretaria Municipal de Saúde de Rio Verde, GO. Informações fornecidas referentes ao ano de 2002.
16. Aydin IO, Ulusain A. Depression, anxiety comorbidity, and disability in tuberculosis and chronic obstructive pulmonary disease patients: applicability of GHQ-12. *Gen Hosp Psychiatry* 2001, 23: 77-83.
17. Rabahi MF, Almeida Neto JC. Tuberculose: Risco ocupacional em profissionais de saúde. *Rev Patol Trop* 2001, 30: 1-8.
18. Kritski AL, Marques MJ, Rabahi MF, Vieira MA, Werneck-Barroso E, Carvalho CE et al. Transmission of tuberculosis to close contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 153: 331-5.