

Novas tecnologias para estudo da tuberculose: Uma análise da detecção e transmissão de *M. tuberculosis* circulante

New technologies for the study of tuberculosis: An analysis of the detection and transmission of circulating *M. tuberculosis*

Maria Lucia Rosa Rossetti^{1,2},
Elis Regina Dalla Costa²,
Marcia Susana Nunes Silva¹,
Natali Linck²,
Pedro Eduardo Almeida da Silva³

¹Curso de pós-graduação em biologia molecular e celular aplicado a Saúde, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Rio Grande do Sul.

²Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Secretaria Estadual da Saúde (SES/RS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

³Fundação Universidade do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul.

Correspondência:

Maria Lucia Rosa Rossetti
Endereço: Rua carvalho Monteiro, 210/201
Petrópolis 90470-100
Endereço eletrônico: mrossetti@terra.com.br
Telefone de contato: 51 34774000/2474 e
984054239

RESUMO

Além de identificar os doentes com tuberculose (TB), é importante monitorar os genótipos de *M. tuberculosis* circulantes. Mesmo após a implantação do Xpert® MTB/RIF, o diagnóstico é ainda realizado apenas pela baciloscopia, que apresenta baixa sensibilidade, na maioria dos laboratórios.

Objetivo: Utilizar análises de DNA para o diagnóstico e identificação dos genótipos circulantes em uma população do Rio Grande do Sul, Brasil.

Metodologia: Amostras clínicas foram analisadas pelo Detect-TB (Labtest, MG), por PCR em tempo real (Xpert® MTB/RIF) e comparados a baciloscopia. A genotipagem foi realizada por spoligotyping.

Resultados: A acurácia do Detect-TB para a identificação da TB foi similar ao Xpert® MTB/RIF, sendo que o Detect-TB foi mais custo-efetivo quando utilizado em conjunto com a baciloscopia. Os genótipos LAM5, RDRio e like-Pinni2, relacionados a resistência ao tratamento, estavam sendo transmitidos neste grupo, e a maioria dos resistentes a isoniazida (78,5%) e dos resistentes a rifampicina (92,1%) apresentavam as mutações mais conhecidas.

Conclusão: A aplicação de tecnologias de DNA pode auxiliar no controle de TB, tanto no diagnóstico rápido quanto na identificação de perfis resistentes, viabilizando tratamento adequado aos pacientes.

Palavras chave: tuberculose, epidemiologia molecular, diagnóstico por PCR, resistência

Projeto financiado pelo edital CHAMADA
FAPERGS/MS/CNPq/SESRS n. 002/2013
PROGRAMA PESQUISA PARA O SUS:
GESTÃO COMPARTILHADA EM SAÚDE
PPSUS – 2013/2015

ABSTRACT

In addition to detecting patients with tuberculosis (TB), it is important to monitor circulating *M. tuberculosis* genotypes. Even after the implantation of Xpert® MTB/RIF, the diagnosis is still based only by bacilloscopy, which have a low sensitivity, in most laboratories.

Objective: To use DNA analysis for diagnosis and identification of circulating genotypes in a population of Rio Grande do Sul, Brazil.

Methodology: Clinical samples were analyzed by Detect-TB (Labtest, MG), real-time PCR (Xpert® MTB/RIF) and compared to bacilloscopy. Genotyping was performed by spoligotyping.

Results: The accuracy of Detect-TB was similar to Xpert® MTB / RIF, but Detect-TB was more cost-effective when used with bacilloscopy. The genotypes LAM5, RDRio and like-Pinni2, related to treatment resistance, were being transmitted among this group, and the majority of the resistant to isoniazid (78.5%) and the resistant to rifampicin (92.1%) presented the most known mutations.

Conclusion: The application of DNA technologies can help in the control of TB, both in rapid diagnosis and in the identification of resistant profiles, allowing adequate treatment to the patients.

Uma pessoa por segundo é infectada por *Mycobacterium tuberculosis* e a transmissão de bacilos está entre as principais questões a serem enfrentadas no controle da tuberculose (TB)¹. Porto Alegre possui uma das maiores incidências entre as capitais brasileiras². Como detectar os casos de tuberculose e trata-los é basicamente uma responsabilidade do Estado, a falta de recursos se reflete em um sistema falho que, por não encontrar o doente ou não o tratar adequadamente, perpetua a doença. A falta de um método de diagnóstico rápido e confiável para a TB agrava a situação. O diagnóstico ainda é feito pela baciloscopia (detecta em torno de 50% dos casos) e em alguns casos pela cultura da bactéria (demorada)³. Apesar da implantação do método molecular Xpert® MTB/RIF pelo Ministério da Saúde (MS), a baciloscopia é ainda o único método de diagnóstico para a maioria dos laboratórios⁴. O Xpert® MTB/RIF, apesar de vantagens, apresenta um preço proibitivo para a maioria das unidades de saúde, o que deixa claro a necessidade de buscar alternativas de produtos nacionais. O nosso grupo já desenvolveu métodos de detecção de DNA de

M. tuberculosis (detect-TB em fase pré-comercial)⁵, para diagnóstico e para a resistência aos principais fármacos do tratamento (detect-TB/MDR)⁶. Porém, apesar do sucesso dos resultados é importante que esses métodos estejam em uma plataforma automatizada, para minimizar problemas inerentes ao teste e a infraestrutura laboratorial exigida.

A complexidade relacionada a TB faz com que, além de detectar e tratar precocemente os casos, também seja importante monitorar os genótipos de *M. tuberculosis* que ocorrem na comunidade. A genotipagem tem sido utilizada para mostrar a relação entre genótipos e aspectos clínicos mais grave da doença como a resistência, falência de tratamento e recidiva da doença⁷. Esses genótipos precisam ser monitorados com estratégias de controle e prevenção que impeçam a sua transmissão.

Objetivo: Este trabalho foi realizado com o objetivo de utilizar as metodologias de análise de DNA para aperfeiçoar um método de diagnóstico de tuberculose por PCR (detect-TB) e adequar este

método para uma plataforma de PCR em tempo real. Além disso, analisar a diversidade genética de *M. tuberculosis* circulantes na região metropolitana, incluindo as mutações gênicas que levam a resistência a isoniazida e rifampicina.

Metodologia: O método Detect-TB (protótipo da Labtest Diagnóstica, MG, Brasil) foi aperfeiçoado e analisado na rotina de diagnóstico de TB da cidade de Canoas (aprovado no comitê de ética (2011-340H). Os resultados comparados com outros laboratórios das cidades de Caxias (RS) e São Paulo (SP). Resumidamente, um fragmento de DNA (IS6110) foi amplificado com primers biotinizados e os produtos foram hibridizados em micropoços com uma sonda complementar à região do fragmento amplificado⁵. O método foi avaliado em uma população prisional e, adicionalmente, o custo-efetividade foi calculado. Posteriormente, a mesma estratégia de PCR, foi adaptada para a plataforma de PCR em tempo real. Os primers (5'-CAGGACCACGATCGCTGAT-3'; e primer reverso: 5'-GCTTCGGACCACCAGCA-3) amplificavam um fragmento de 73 bp da região de S6110. A reação foi 1 ciclo a 50°C por 2 min. Com uma desnaturação inicial de 95°C por 10 min., seguida de 55 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg., e anelamento e amplificação a 60°C por 1 min. O sequenciamento dos genes envolvidos com a resistência (*katG* e *rpoB*), a detecção de RDRio por uma PCR multiplex e a genotipagem por spoligotyping foram realizadas conforme descrito anteriormente pelo grupo⁷.

Resultados: Em relação aos testes de acurácia do Detect-TB, quando comparado aos resultados de microscopia e cultura, a sensibilidade e a especificidade foram 84,6% (IC 95%; 73,7-91,6) e 93,1% (IC 95%; 89,1-95,8), respectivamente. Quando comparado aos critérios bacteriológicos e clínicos, a sensibilidade e especificidade foram 74,3% (IC 95%; 63,3-82,9) e 92,9% (IC 95%; 88,7-95,6), respectivamente⁸. O Detect-TB mostrou ser custo-efetivo quando utilizado junto com a baciloscopia⁹. Nas análises por PCR em tempo real, a sensibilidade e a especificidade em comparação com a baciloscopia e/ou cultura foram 92,1% e 62,0%, respectivamente. Em comparação com o desfecho clínico foram de 93,3% e 55,5%. A concordância com o teste detect-TB foi dada pelo índice Kappa de 0,56 ($P < 0,001$) ($n = 197$)¹⁰.

A identificação dos genótipos de *M. tuberculosis* circulantes na região metropolitana mostrou que 37% eram pertencentes a família LAM (incluindo LAM5 e RDRio). Os demais genótipos mais frequen-

tes eram T1 e Haarlem¹¹. Foi também identificado uma linhagem like-Pinni2, que nosso grupo demonstrou por várias técnicas complementares que, erroneamente, ela era classificada como *Mycobacterium pinnipedii*¹². Quando os dados clínicos epidemiológicos dos pacientes foram analisados junto com os genótipos de isolados em Porto Alegre, ficou evidente que a recorrência de TB, após cura era significativamente maior em pacientes com HIV¹³.

Em relação aos estudos sobre a resistência, foi constatado que em Canoas a prevalência foi de 12%, sendo 8% de resistência primária e 5% de monoresistência a isoniazida. Desses, 78,5% dos resistentes a isoniazida apresentavam mutação no gene *katG* (93%, no códon 315) e 72,5% na região promotora do gene *inhA11*. Dos resistentes a rifampicina, 92,1% tinham mutações no gene *rpoB* (57% no codon 531). A presença de uma inserção de 12 nucleotídeos entre os códons 516 e 517 do gene *rpoB* foi encontrada em cinco dos MDR¹⁴.

Discussão: Neste projeto foi abordada a utilização de tecnologias moleculares de diagnóstico e genotipagem para o enfrentamento da TB. Um teste de diagnóstico baseado em PCR, previamente desenvolvido pelo grupo (transferido para a empresa Labtest, MG) foi analisado quanto a acurácia⁸ e ao custo-efetividade⁹. Os resultados foram similares aos relatados em estudos que avaliaram o Xpert® MTB/RIF (sensibilidade de 79 a 97% e especificidade de 96 a 99%)^{15,16}. Isso indica que este teste, poderia ser utilizado na rotina dos serviços de saúde. No entanto, a sua execução é mais demorada e envolve mais etapas que o comercial. Por essa razão, nosso grupo investiu na transferência do teste para uma plataforma de tempo real (mesma do Xpert® MTB/RIF). Na validação de fase I, os resultados mostraram que o teste foi capaz de detectar a TB com uma alta sensibilidade (92,1%) em até 6 h, porém mais experimentos serão necessários para melhorar a especificidade (62,0%).

As análises de genotipagem confirmaram que a principal família de *M. tuberculosis* encontrada no sul do Brasil é LAM (inclusive LAM5), assim como em Santa Catarina¹⁷. Em outros estados do Brasil, as taxas de genótipos LAM variaram de 45,3 a 66,34%, 18,19,20. Também, foram identificadas linhagens RDRio que está fortemente correlacionada com a resistência¹⁸ e like-Pinni2 que nosso grupo corretamente classificou como também da família LAM¹². Também, foi possível conhecer a resistência de *M. tuberculosis* (12%) aos principais

fármacos na cidade de Canoas (primeiro relato), o que foi uma importante contribuição deste estudo, uma vez que os testes de susceptibilidade não são de rotina. A frequência de mutação nos genes katG e rpoB em *M. tuberculosis* MDR encontrada, foi alta como em outros estudos no Brasil e demais países^{21,22}. Isso confirma a possibilidade de utilização de testes moleculares para identificar a resistência aos fármacos isoniazida e rifampicina.

Conclusão: O Detect-TB, teste molecular nacional, mostrou acurácia e custo efetividade para ser utilizado na rotina de diagnóstico de TB dos serviços de saúde e com a possibilidade de redução do tempo de execução, quando sua automação for concluída. A identificação de linhagens de *M. tuberculosis* relacionadas com pior prognóstico da doença indicaram a necessidade de ações de prevenção e controle da TB, além do diagnóstico e tratamento precoce. Assim, pode ser concluído que, um investimento na aplicação de novas tecnologias na rotina de diagnóstico de TB pode colaborar no enfrentamento da doença.

PARTICIPAÇÃO DOS AUTORES

Maria Lucia Rosa Rossetti - Responsável pelo desenho, organização e redação do projeto e manuscritos. Orientação de alunos e análise de resultados. Análises por PCR.

Pedro Eduardo Almeida da Silva – Responsável pelos testes de susceptibilidade e MIC de *M. tuberculosis*.

Elis Regina Dalla Costa - Responsável pelas análises de *M. tuberculosis* por spoligotyping e sequenciamento e redação dos artigos.

Márcia Susana Nunes Silva- Responsável pelas etapas relacionadas ao cultivo de *M. tuberculosis* e baciloscopia das amostras dos pacientes.

Natali Linck - Responsável pela coleta de dados e análises estatísticas de *M. tuberculosis*.

REFERÊNCIAS

1. WHO. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Genebra: World Health Organization; 2016 [Cited 2017 Feb 16]. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/ em. Acesso em 15 de agosto de 2017.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Estadual da saúde. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/lista/210/Tuberculose>. Acesso em 12 de janeiro de 2016.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações do controle da tuberculose, 2010. Disponível em: manual de recomendações de controle de TB novo. acesso em 01 de junho de 2017.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde. Detectar, tratar e curar: desafios e estratégias brasileiras frente à tuberculose. 2015; (46): 1–19.

5. Michelon CT, Rosso F, Schmid KB, Sperhacke RD, Oliveira MM, Kritski AL, Rezende Jr L, Costa ER, Ribeiro AW, Verza M, Cafrune PI, Silva MS, Kuhleis D, Zaha A, Rossetti ML. Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Mar;106(2):194-9.
6. Ferreira Junior SL, Dalla Costa ER, Santos PG, Gomes HM, Silva MS, Esteves LS, Oliveira MM, Maschmann Rde A, Kritski AL, Suffys PN, Rossetti ML. In house reverse membrane hybridisation assay versus GenoType MTBDRplus and their performance to detect mutations in the genes *rpoB*, *katG* and *inhA*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Jun;109(3):307-14.
7. Kuhleis D, Ribeiro AW, Costa ER, Cafrune PI, Schmid KB, Costa LL, Ribeiro MO, Zaha A, Rossetti ML. Tuberculosis in a southern Brazilian prison. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Nov;107(7):909-15.
8. Verza M, Schmid KB, Barcellos RB, Linck N, Bello GL, Scapin D, Sperhacke RD, Silva MS, Wollheim C, Riveiro MG, Kritski AL, Rezende L Jr, Oliveira MM, Costa ER, Rossetti ML. Performance of a molecular assay to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in clinical specimens: multicenter study in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017 Feb;112(2):94-99.
9. Schmid, K, Scherer, L, Barcellos, RB ; Kuhleis, D, Prestes, IV, Steffen, RE, Dalla Costa, ER; Rossetti, MLR. Smear plus detect-TB for a sensitive diagnosis of pulmonary tuberculosis: a cost-effectiveness analysis in an incarcerated population. *BMC Infectious Diseases*, 2014, v. 14, p. 1.
10. Schmid, KB. Comparação de duas metodologias moleculares para o diagnóstico de tuberculose. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.
11. Linck, N. Análise da tuberculose pulmonar no município de Canoas e caracterização molecular de *Mycobacterium tuberculosis*. Tese de doutorado, Universidade Luterana do Brasil, 2016.
12. Dalla Costa, ER, Vasconcelos, S, Esteves, LS, Gomes, HM, Gomes, LL, Almeida da Silva, P, Perdigão, J, Portugal, I, Viveiros, M, Mcnerney, R, Pain, A, Clark, Taane, G, Rastogi, N, Unis, G, Rossetti, MLR, Suffys, Philip, N . Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Latin American Mediterranean lineage wrongly identified as *Mycobacterium pinnipedii* (ST863) causing active tuberculosis in south Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, v. 53, p. JCM.02012-15.
13. Unis, G, Ribeiro, A, Esteves, L, Spies, F, Picon, P, Dalla Costa, ER ; Rossetti, MLR. Tuberculosis recurrence in a high incidence setting for HIV and tuberculosis in Brazil. *BMC Infectious Diseases*, 2014 (Online), v. 14, p. 548.
14. Esteves, LS. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a isoniazida e rifampicina no Rio Grande do Sul. Dissertação, Universidade Luterana do Brasil, 2015.
15. Yoon C, Cattamanchi A, Davis JL, Worodria W, den Boon S, Kalema N, Katagira W, Kaswabuli S, Miller C, Andama A, Albert H, Nabeta P, Gray C, Ayakaka I, Huang L. Impact of Xpert MTB/RIF testing on tuberculosis management and outcomes in hospitalized patients in Uganda. *PLoS One*. 2012;7(11):e 48599.
16. Roos BR, van Cleeff MR, Githui WA, Kivihya-Ndugga L, Odhiambo JA, Kibuga DK, Klatser PR: Cost-effectiveness of the polymerase chain reaction versus smear examination for the diagnosis of tuberculosis in Kenya: a theoretical model. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998, 2(3):235–241. PubMed, PMID: 9526197.
17. Nogueira CL, Prim RI, Senna SG, Rovaris DB, Maurici R, Rossetti ML, Couvin D, Rastogi N, Bazzo ML. First insight into the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina, southern Brazil. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016 Mar;97:57-64.
18. Dalla Costa, ER, Lazzarini, LCO, Perizzolo, PF, Díaz, CA, Spies, FS, Costa, LL, Ribeiro, AW, Barroco, C, Schuh, SJ, Pereira, MAS, Dias, CF, Gomes, HM, Unis, G, Zaha, A, da Silva, PEA, Suffys, PN, Rossetti, MLR. *Mycobacterium tuberculosis* of the RDRio Genotype Is the Predominant Cause of Tuberculosis and Associated with Multidrug Resistance in Porto Alegre City, South Brazil, *J Clin Microbiol*. 2013 Apr; 51(4): 1071–1077.
19. Vasconcellos SEG, Acosta CC, Gomes LL, Conceição EC, Lima KV, de Araujo MI, Leite ML, Tannure F, Caldas PCS, Gomes HM, Santos AR, Gomgnimbou

- MK, Sola C, Couvin D, Rastogi N, Boechat N, Suffys PN. Strain classification of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Brazil based on genotypes obtained by spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive unit typing and the presence of large sequence and single nucleotide polymorphism. *PLoS ONE*. 2014;9:e107747.
20. Dantas NGT, Suffys PN, Carvalho WS, Gomes HM, de Almeida IN, de Assis LJ, Augusto CJ, Gomgnimbou MK, Refregier G, Sola C, Miranda SS. Genetic diversity and molecular epidemiology of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Minas Gerais State, Brazil. *BMC Infect Dis*. 2015;15:306.
21. Escalante P, Ramaswamy S, Sahabria H, Soini H, Pan X, Valiente-Castillo O, et al. Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tuber Lung Dis*. 1998;79(2):111-8.
22. Perizzolo PF, Dalla Costa ER, Ribeiro AW, Spies FS, Ribeiro MO, Dias CF, et al. Characteristics of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. *Tuberculosis*. 2012;92(1):56-9.