SAU-01

# TUBERCULOSE EM INDÍGENAS YANOMAMIS: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Alessandra Cristina Martins da Silva[(1)], Mauricio Morishi Ogusku[(2)], Julia Ignez Salem[(2)].
[(1)]Bolsista CNPq/PIBIC – INPA, [(2)]Orientadores INPA/CPCS,

Estudos diagnósticos realizados no Laboratório de Micobacteriologia do INPA nos últimos 5 anos vêm constatando a baixa sensibilidade da baciloscopia em secreções pulmonares de indígenas com suspeita diagnóstica de Tuberculose (Tb). Também têm observado a alta taxa de contaminação dos meios de cultivo devida a coleta da amostra de escarro ser realizada sem os padrões de higiene oral necessários e o período de tempo demandado entre a colheita da amostra e o seu processamento bacteriológico ser superior a 3 dias. Aplicar uma técnica com a mesma acuidade do cultivo foi intenção do presente trabalho, já que a Tb é uma das doenças infecciosas mais graves que atinge os índios Yanomamis da região do Rio Cauaburis (alto Rio Negro). Em 2000, o Laboratório de Micobacteriologia do INPA realizou exames bacteriológicos em amostras de escarro de Yanomamis sintomáticos respiratórios, remetidas pelo Coordenador do Instituto Brasileiro pelo Desenvolvimento Sanitário (IBDS), por ser, perante o Ministério da Saúde, o responsável pelas ações básicas de saúde da população indígena do Rio Cauaburis. Na época, todas as amostras de escarro foram processadas bacteriologicamente, tendo-se o cuidado de estocar a -20°C uma alíquota de 1 mL do escarro descontaminado visando futuros estudos moleculares tais como o diagnóstico de Tb pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Mediante o exposto os seguintes objetivos foram propostos: verificar a acuidade da PCR com *primers* para região IS*6110* do *M. tuberculosis* em relação às técnicas bacteriológicas de diagnóstico da Tb e avaliar em que percentual a técnica ampliaria o diagnóstico em amostras de secreções pulmonares de indígenas sintomáticos respiratórios com suspeita de Tb .

Para atingir os objetivos, 44 amostras descontaminadas de escarro tiveram os DNA extraídos de acordo com Ogusku et al. (2003): 200 µL do escarro descontaminado foi centrifugado a 12.000 rpm por 10'. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 200 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH8,0 e 0,5 mM EDTA). Após homogeneização, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 10' e o sobrenadante removido. A amostra foi ressuspensa em 250 µL de tampão de lise (100mM Tris-HCl pH 8,0; 5mM EDTA; 1% Tween20; 1% Triton X-100 e 400 µg/mL Proteinase K) e incubada a 56°C por um pernoite. Após esse período, a amostra foi incubada a 100°C por 10'. Incubações alternadas da amostra em banho de gelo por 2' e a 100°C por 2' foram repetidas 3 vezes. O DNA foi purificado com fenol-clorofórmio e precipitado com etanol

absoluto (Davis et al., 1994). As amostras foram submetidas a PCR com primers para IS*6110*, e posteriormente, a uma separação eletroforética em gel de agarose a 1,5%, o qual foi corado com brometo de etídeo e visualizado sobre luz ultra-violeta.

Os resultados do exame bacteriológico de baciloscopia confirmam e evidenciam a baixa sensibilidade da técnica como método diagnóstico nos casos de Tb paucibacilar, forma clínica que predomina nos indígenas. Entretanto, nas amostras estudadas, o cultivo em meio de Lowenstein-Jensen, considerado o "Padrão Ouro" no diagnóstico laboratorial de Tb, proporcionou o isolamento de *M. tuberculosis* em apenas 2 amostras. Por outro lado, a PCR foi positiva em 22 amostras e sua correlação com os resultados do cultivo estão apresentados no quadro.

As 21 amostras de escarro positivas na PCR e negativas no cultivo, representam um aumento de 47,7% na detecção de DNA de *M. tuberculosis*. Entretanto, esses resultados não podem ser considerados como ampliação diagnóstica visto haver a necessidade de confronta-los com a evolução clínica dos pacientes, ao longo dos últimos 3 anos. Para tanto, faz-se necessário que as informações evolutivas de cada indivíduo sejam resgatadas junto ao Instituto Brasileiro pelo Desenvolvimento Sanitário (IBDS). Após resgate, as informações clínicas serão correlacionadas com os resultados bacteriológicos e moleculares para conclusão da especificidade e da sensibilidade da PCR em amostras paucibacilares.

Quadro – Correlação entre os resultados da PCR e cultivo.

| Técnicas | | Cultivo para *M. tuberculosis* | | Total |
|---|---|---|---|---|
| | | Positivo | Negativo | |
| PCR | Positivo | 01 | 21 | 22 |
| | Negativo | 01 | 21 | 22 |
| Total | | 02 | 42 | 44 |

Sensibilidade = 50% Especificidade = 50%

Bibliografia:

Ogusku, M.M.; Sadahiro, A; Hirata, M.H.; Hirata, R.D.C.; Zaitz, C.; Salem, J.I. 2003. PCR in the Diagnosis of Cutaneous Tuberculosis. Brazilian Journal of Microbiology, (no prelo).

Davis, L.G.; Kuehl, W.M.; Battey, J.F. 1994. Basic Methods in Biology Molecular. Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut. 775p.