

ARTIGO ORIGINAL

Sondas de RNA ribossómico no diagnóstico da tuberculose humana

RAUL AZEVEDO-BERNARDA^{1*}, LUIS MESQUITA^{2*}, MARILIA DOURADO^{3*},
CELESTE ALCOBIA^{4**}, CARLOS ROBALO CORDEIRO^{5*},
MARGARIDA PACHECOMENDES^{6*}

Serviço: *Instituto de Patologia Geral, Faculdade de Medicina de Coimbra
(Director: Prof. Doutor Raul de Azevedo Bernarda)
3006 COIMBRA CODEX

**Serviço de Tuberculose e Doenças Respiratórias de Coimbra
(Director: Dr. Manuel Veloso do Reis)
Av. Bissaya Barreto
3000 COIMBRA

RESUMO

Tendo em vista um mais rápido e específico diagnóstico laboratorial da tuberculose, os autores avaliaram esta tecnologia usando para tal 15 amostras desconhecidas, avaliaram ainda as condições ambientais do seu laboratório, o que para este tipo de tecnologia é particularmente crítica.

Palavras-chave: Tuberculose, RNA, Sondas.

¹Professor Catedrático de Patologia Geral da Faculdade de Medicina de Coimbra.

²Técnico Superior do Instituto de Patologia Geral da Faculdade de Medicina de Coimbra.

³Assistente Estagiária de Patologia Geral da Faculdade de Medicina de Coimbra.

⁴Assistente Hospitalar de Pneumologia do S.T.D.R. de Coimbra.

⁵Assistente Convidado de Patologia Geral da Faculdade de Medicina de Coimbra.

⁶Técnica Principal de Análises Clínicas e Saúde Pública do Instituto de Patologia Geral da Faculdade de Medicina de Coimbra.

Recebido para publicação em 95.3.29

Aceite para publicação em 95.4.20

ABSTRACT

In view of a quicker and more specific laboratorial diagnosis of tuberculosis, the authors valuated this technology using for that purpose 15 unknown samples, and also valuated the environmental conditions of their laboratory which is especially critical in this kind of technology.

Key-words: Tuberculosis, RNA, Probes.

INTRODUÇÃO

Os métodos de diagnóstico laboratorial não culturais da tuberculose humana, aplicados directamente na amostra, envolvem tecnologia que possibilitam a detecção do RNA ribossómico de cinco micobactérias associadas à tuberculose humana, responsáveis por uma significativa mortalidade.

O *Micobacterium tuberculosis* é o seu mais usual membro isolado de humanos. O *Micobacterium bovis* pode ser transmitido dos animais para o homem. O *Micobacterium africanum* é o agente mais vulgar de tuberculose na África Tropical e o *Micobacterium microti* que, primariamente, infecta os animais (1).

MATERIAL E MÉTODOS

O método analítico consiste na amplificação de uma sequência alvo do RNA de bactérias viáveis utilizando, para tal, uma cópia do DNA (cDNA) obtida por acção da Transcriptase Inversa e nucleótidos trifosfatados. Pudemos, assim, amplificar 10.000 milhões de vezes o RNA da amostra (2,3).

Posteriormente, uma sonda DNA marcada com ester de acridina, substância luminescente e estereoquimicamente protegida, por a sua molécula se encontrar voltada para dentro do complexo RNA-DNA tornando, assim, possível, sem posteriores separações físicas, quantificar por luminometria apenas o ester de acridina efectivamente hibridado. A esta tecnologia convencionou-se chamar HPA (Hybridization Protection Assay).

O controlo da técnica é feito com uma amostra positiva constituída por uma suspensão aquosa de micobactérias e com uma amostra negativa de água exposta a possíveis contaminações atmosféricas por aerossóis no ambiente de trabalho.

Analisámos 15 amostras – 13 expectorações e 2 líquidos de lavagem broncoalveolar – de doentes com tuberculose clínica e baciloscopias positivas. Como grupos de controlo analisámos 10 líquidos de lavagem broncoalveolar com patologias pulmonares não tuberculosas.

RESULTADOS

Considera-se o valor de luminescência, para os positivos, igual ou superior a 30.000 RLU (Relative Light Units) e inferior a este valor para os negativos. Todas as nossas amostras com baciloscopia positiva apresentaram um valor médio superior a 2.000.000 RLU, o que confere à técnica uma elevadíssima especificidade (a diferença de apenas uma base no RNA replicado num total de 25 é suficiente para que a protecção estereoquímica do ester de acridina não seja possível).

O valor de sensibilidade obtida para esta técnica foi de 100%, o que prova a elevadíssima afinidade e complementaridade das sondas de DNA dirigidas a sequências de rRNA do complexo de micobactérias usadas.

CONCLUSÕES

O método revela-se como o mais rápido e rigoroso no diagnóstico laboratorial da tuberculose visto que,

teoricamente, é possível disponibilizar o resultado em menos de 24 horas.

Tem a vantagem de o Ácido Nucleico amplificado –RNA– ser muito mais lábil que o DNA, o que diminui o número de falsos positivos (4).

Esta tecnologia requer a preparação adequada e ambiente próprio para a sua execução eficaz. Contaminações de amostras negativas podem surgir através de pipetas inadequadamente usadas ou ambiente contaminado com a presença próxima de culturas ou amostras.

BIBLIOGRAFIA

1. VIVIAN J, ALDEN MJ, CURRY J, KAMISANGO K, KNOTT CA, LANKFORD R, WOLFE JM, MOORE DF: Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Directly from Sputum Sediments by Amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.*, Setembro 1993; 31 (9): 2410-2416.
2. ABE C, HIRANO K, WADA M, KAZUMI Y, TAKAHASHI M, FUKASAWA Y, YOSHIMURA T, MIYAGI C, GOTO S: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens by Polymerase Chain Reaction and Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test. *J. Clin. Microbiol.*, Dezembro 1993; 31 (12):3270-3274.
3. MILLER N, HERNANDEZ SG, CLEARTT TJ: Evaluation of Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test and PCR for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.*, Fevereiro 1994; 32 (2):393-397.
4. ADAMS RLP: DNA Replication. IRL Press, ed., 1991.