

Artigo original

Avaliação de um protótipo para coleta de *Mycobacterium tuberculosis* em aerossóis gerados pela tosse.

Evaluation of a collection prototype for *Mycobacterium tuberculosis* aerosols generated by cough.

Rosemeri Maurici da Silva¹, Leticia Keiko Mori², Maria Luiza Bazzo³, Mariana Chagas⁴.

RESUMO

Objetivo: Desenvolver um protótipo de coleta de *Mycobacterium tuberculosis* em aerossóis gerados pela tosse, recuperando-os através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Metodologia:** A primeira etapa avaliou a viabilidade da captação do *M. tuberculosis* presente em aerossóis gerados pela tosse. Foi desenvolvido um protótipo de coleta utilizando-se o Intersurgical Clear-Therm 3 filter + HME[®] com um disco FTA (Whatman Bioscience[®]) sobre o filtro interno. Este protótipo foi testado em uma paciente com tuberculose pulmonar bacilífera, no período de 8 horas, nos momentos de tosse espontânea. A segunda etapa foi realizada em pacientes com tuberculose pulmonar ou suspeita clínica. O paciente era orientado a tossir por três vezes consecutivas dentro do protótipo de coleta de aerossóis, que era constituído de um copo plástico com um disco FTA (Whatman Bioscience[®]) em seu interior. Foi avaliado o rendimento da recuperação por PCR do *M. tuberculosis* no material obtido pela tosse e coletado através do protótipo, considerando padrão-áureo a baciloscopia e cultura realizadas em amostras de escarro.

Resultados: A análise do material coletado na primeira etapa revelou resultado positivo na PCR. Na segunda etapa, foram avaliados 18 pacientes. Cinco pacientes foram excluídos do estudo por não apresentarem expectoração espontânea. Dos 13 restantes, 9 eram do gênero masculino. A média de idade foi de 37,57 anos (DP ± 10,4). Foram realizadas 13 baciloscopias, com 3 resultados positivos. Foram feitas 7 culturas, com 5 resultados positivos. A PCR não apresentou resultados positivos.

Conclusão: A recuperação do bacilo pelo primeiro protótipo confirma a efetividade do disco FTA (Whatman Bioscience[®]) e da PCR, porém o protótipo avaliado na segunda etapa não foi eficaz na recuperação do microorganismo.

Descritores: Aerossóis; tuberculose; PCR.

ABSTRACT

Objectives: Developed a collection prototype for *Mycobacterium tuberculosis* aerosols generated by cough and recaptured by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. **Methodology:** The first phase evaluated the viability of the capturing of *M. tuberculosis* present in aerosols generated by cough. A prototype collection using Intersurgical Clear-Therm 3 filter + HME[®] with a FTA (Whatman Bioscience[®]) disc over the internal filter was developed. It was tested on a patient with bacillary lung tuberculosis, in a period of 8 hours, in the moments of spontaneous cough. The second phase was realized in patients with lung tuberculosis, or clinical suspicions. The patients were told to cough three times consecutively into the aerosol collection prototype that was composed of a plastic cup with a FTA disc (Whatman Bioscience[®]) in its interior. The recapturing performance rates of the airborne *M. tuberculosis* by the PCR was evaluated. Results obtained in the sputum baciloscopia and cultures were considered gold-standard.

Results: The analysis of the collected material in the first phase reveal positive results in the PCR. In the second phase of the study, 18 patients were evaluated and 5 were excluded. Of the 13 remaining, 9 were of the masculine gender. The average age was 37.7 years (DP±10.4). Thirteen sputum baciloscopias were realized and 3 had positive results. Seven culture tests were realized with 5 positive results. The PCR technique had negative results. **Conclusion:** The recapturing of the bacilli by the first prototype confirms the effectiveness of the FTA disk and the PCR technique, on the other hand, the prototype evaluated in the second phase was not efficient in the recapturing of the microorganism.

Keywords: Aerosols; tuberculosis; PCR.

1. Doutora em Medicina/Pneumologia. Professora do Curso de Medicina da Universidade do Sul de Santa Catarina (Unisul).

2. Acadêmica do Curso de Medicina da Universidade do Sul de Santa Catarina (Unisul).

3. Doutora em Microbiologia. Professora da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4. Bioquímica. Mestranda em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Trabalho realizado na Universidade do Sul de Santa Catarina (Unisul) e Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Não há conflito de interesse. Financiador da Pesquisa: Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica de Santa Catarina (FAPESC).

Endereço para correspondência: Rosemeri Maurici da Silva. Rua Moçambique, 852, Rio Vermelho, CEP 88060415, Florianópolis, SC. Telefone: (0XX48)99822796, e-mail: rosemaurici@hotmail.com.

Recebido em 10/01/2008 e aceito em 21/02/2008, após revisão.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença de caráter crônico, causada por bactérias do grupo *Mycobacterium tuberculosis*. Sua transmissão ocorre por disseminação aérea da bactéria, através da tosse, espirro e fala, no contato muito próximo com pessoas infectadas. Ambientes fechados como creches e asilos, principalmente no inverno, são locais onde o contágio ocorre com maior facilidade.¹

Estimativas da Organização Mundial da Saúde indicam que, a cada ano, 16 milhões de pessoas adoecem, 8,2 milhões de novos casos são diagnosticados e cerca de 1,8 milhões de pessoas morrem em consequência da tuberculose. A taxa de incidência da doença no Brasil é de 26 casos para cada 100.000 habitantes, sendo, em Santa Catarina, de 27 casos para cada 100.000 habitantes.^{2,3}

Essa doença é mais comum na faixa etária entre 15 e 50 anos, podendo se manifestar na forma pulmonar ou extra-pulmonar, onde o quadro clínico atípico dificulta o diagnóstico.⁴

O diagnóstico da tuberculose pulmonar é realizado através da cultura nas amostras de escarro. Para investigação do *Mycobacterium tuberculosis*, deve-se ter uma amostra representativa das vias aéreas inferiores. São coletadas duas amostras, a primeira na própria consulta e a próxima no dia seguinte, ao despertar. A coleta deve ser realizada em ambiente aberto e ventilado, em potes descartáveis, limpos, com tampa rosqueada, boca larga e capacidade de 30 a 50 mL. O paciente, antes de se submeter à coleta do escarro, deve lavar a boca com água, para eliminar resíduos. Deve inspirar profundamente, mantendo por um tempo o ar no pulmão, e depois tossir, lançando o material no recipiente, repetindo até três eliminações.⁵

A baciloscopia direta pela coloração de Ziehl-Neelsen é o método mais utilizado para diagnóstico de probabilidade da tuberculose pulmonar, devido a sua rapidez, simplicidade, baixo custo e elevado valor preditivo positivo. O ponto negativo desta técnica diagnóstica é a necessidade de grande quantidade de bacilos (pelo menos 5000 bacilos por mililitro de amostra). Assim, é preciso lesões extensas, onde se encontram grandes quantidades de bacilos, para que a técnica tenha boa acurácia.^{1,4}

A cultura permite identificar a micobactéria, sendo o exame positivo, mesmo na presença de pequeno número de bacilos, possibilitando o diagnóstico de lesões iniciais e paucibacilares. Porém, o resultado só é possível em um período de 3 a 6 semanas.^{1,4}

Sabe-se que o diagnóstico precoce da doença aumenta as chances de cura e reduz, substancialmente, a morbimortalidade.⁴ Indivíduos que apresentam o quadro paucibacilar da doença obtém o diagnóstico pela cultura, o que leva, em média, 3 a 6 semanas. Além disso, grande parte dos pacientes não apresenta expectoração espontânea, necessitando, por vezes, de técnicas

invasivas, ou da indução de escarro, para a obtenção das amostras respiratórias.^{1,6}

Uma das alternativas diagnósticas seria a recuperação do bacilo diretamente do material aerossolizado através da tosse, onde, sabidamente, se pode encontrar o agente infeccioso.

Fennelly e colaboradores, pioneiramente, desenvolveram um equipamento de coleta e mensuração do tamanho e concentração das partículas eliminadas pela tosse, em indivíduos com tuberculose pulmonar, demonstrando que esta técnica é factível.⁷

Baseando-nos na premissa de que a recuperação do microrganismo em aerossóis gerados pela tosse é possível, acreditamos que o desenvolvimento de uma técnica alternativa de coleta teria impacto, tanto no diagnóstico precoce como na interrupção da cadeia de transmissão da doença, principalmente em indivíduos sem expectoração espontânea ou paucibacilares.

Apoiados nesta premissa, propusemo-nos a desenvolver um protótipo de coleta de *Mycobacterium tuberculosis* em aerossóis gerados pela tosse, recuperando-os pela da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), e comparar o rendimento, tomando como padrão áureo a baciloscopia e a cultura no escarro.

METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado em duas etapas.

A primeira etapa consistiu na avaliação da viabilidade da captação de *Mycobacterium tuberculosis* presente em aerossóis gerados pela tosse, em um disco FTA (Whatman Bioscience®), e recuperação do mesmo através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para tal, foi desenvolvido um protótipo de coleta utilizando-se o Intersurgical Clear-Therm 3 filter + HME®, onde foi colocado um disco FTA (Whatman Bioscience®) sobre o filtro interno. Este protótipo (Figura 1) foi testado em um paciente do gênero feminino, com diagnóstico de tuberculose pulmonar bacilífera (+ +), a qual, durante o período de 8 horas consecutivas, nos momentos de tosse espontânea, levou a extremidade do protótipo à boca e realizou a coleta dos aerossóis.

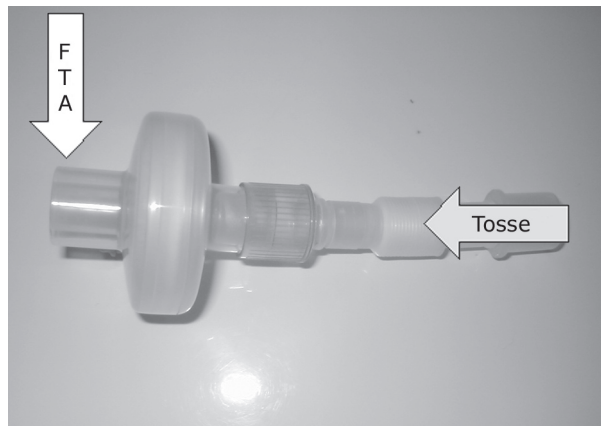


Figura 1 - Intersurgical Clear-Therm 3 filter + HME®

A segunda etapa da pesquisa foi realizada no período de 1º de julho a 30 de agosto de 2007, onde foram avaliados todos os pacientes com idade superior a 18 anos, com tuberculose pulmonar ou com suspeita clínica de tuberculose pulmonar, atendidos no Centro de Atendimento Especializado em Saúde (CAES), em Tubarão (SC).

Todos os que preencheram os critérios de inclusão acima citados foram convidados a participar, sendo orientados quanto ao estudo e à técnica diagnóstica, e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram excluídos do estudo aqueles indivíduos que não apresentaram expectoração espontânea.

Após tal procedimento, os participantes foram cadastrados em ficha de inclusão e realizaram coleta de escarro para baciloscopia e cultura, de acordo com as orientações preconizadas pelo Ministério da Saúde.⁵ As amostras de escarro foram, imediatamente, encaminhadas para o Laboratório de Análises Clínicas, para a realização de baciloscopia pela técnica de Ziehl-Neelsen e cultura em meio de Löwenstein-Jensen.

No mesmo momento, o participante foi orientado a realizar manobras de inspiração profunda e tossir, por três vezes consecutivas, dentro do protótipo de coleta de aerossóis. O protótipo de coleta constituiu-se de um copo plástico com um disco FTA (Whatman Bioscience®) em seu interior (Figuras 2, 3 e 4), desenvolvido pelos autores.



Figura 2 – Protótipo de Coleta (vista anterior).



Figura 3 – Protótipo de Coleta (vista superior com tampa).

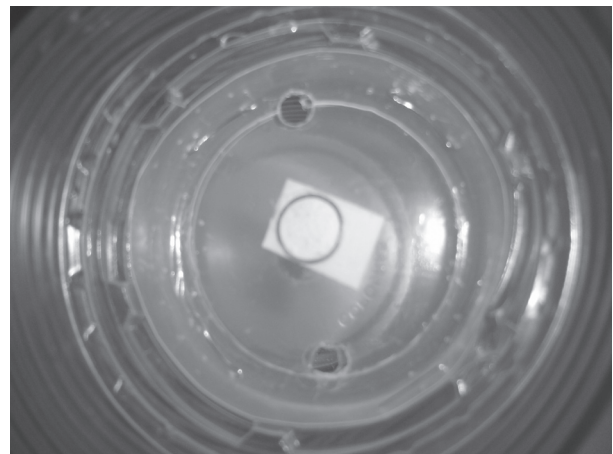


Figura 4 – Protótipo de Coleta (vista superior sem tampa).

De cada amostra fixada no papel filtro “FTA classic cards” (FTA) (Whatman Bioscience®) foram feitos dois cortes de 3mm de diâmetro cada um. Os cortes foram colocados em tubos para PCR de 200 µl (Axygen®), previamente identificados. Em seguida, foram adicionados, a cada tubo, 200 µl do reagente de purificação “FTA purification reagent” (RP) (Whatman®) e, após homogeneização, os tubos foram incubados a temperatura ambiente, por 5 minutos. Decorrido este tempo, o RP foi totalmente removido e descartado. O processo de adição do RP, homogeneização, incubação e remoção do RP foi repetido mais duas vezes. Após a última remoção do RP, foram adicionados, a cada tubo, 200 µL de TE (10mM Tris/Cl; 0,1mM EDTA, pH 8,0). Os tubos foram homogeneizados e incubados a temperatura ambiente, por 5 minutos, e, ao final da incubação, o TE foi removido. As etapas de adição do TE, homogeneização, incubação e remoção do TE foram repetidas mais uma vez. Após a última remoção, os discos secaram a temperatura ambiente, durante uma hora, e foram utilizados como molde (DNA) na reação de PCR.⁸

As variáveis foram sumarizadas como porcentagem ou média, conforme indicado. Foi avaliado o rendimento da recuperação por PCR do *Mycobacterium tuberculosis* no material aerossolizado obtido pela tos-

se e coletado através do protótipo, tomando-se como padrão áureo os resultados obtidos na baciloscopia e cultura do material expectorado.

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade do Sul de Santa Catarina (Parecer 07.150.4.01.III).

RESULTADOS

A análise do material coletado na primeira etapa da pesquisa revelou resultado positivo na Reação em Cadeia da Polimerase para *Mycobacterium tuberculosis*.

Uma vez confirmada a possibilidade de recuperação do *M. tuberculosis* em aerossóis gerados pela tosse, através do uso de discos FTA, foi iniciada a segunda fase da pesquisa.

Na segunda fase foram avaliados 18 pacientes com suspeita de tuberculose, com idade acima de 18 anos, dentre os quais foram excluídos 5 pacientes, pois não tiveram escarro para a realização da baciloscopia e da cultura, como exames comparativos à técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR).

Dos 13 pacientes restantes, 9 (69,23%) eram do gênero masculino e 4 (30,77%) do gênero feminino.

A média de idade foi de 37,57 anos, sendo a mediana de 35 e o desvio-padrão de 10,4.

Foram realizadas um total de 13 baciloscopias, com 3 (23,07%) resultados positivos e 10 (76,92%) negativos. A cultura foi realizada em 7 pacientes, dos 13 que fizeram a baciloscopia, onde 5 (71,43%) pacientes apresentaram resultado positivo e 2 (28,57%), resultado negativo. Dos 7 pacientes que realizaram ambos os exames, 5 (71,43%) tiveram resultados compatíveis com tuberculose pulmonar. Esses resultados foram positivos, tanto na baciloscopia como na cultura, em 3 (42,85%) pacientes; foram negativos em 2 (28,57%) e os outros 2 (28,57%) foram recuperados apenas na cultura.

A técnica por PCR, que foi realizada através de um protótipo com a finalidade de recuperar o *M. tuberculosis* através de três tosses consecutivas dos 13 pacientes avaliados, teve todos seus resultados negativos.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a recuperação do bacilo, através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de *Mycobacterium tuberculosis* em aerossóis gerados pela tosse e capturados em discos FTA, é factível em pacientes sabidamente bacilíferos e que realizem a coleta por longo período de tempo (8 horas); porém, a recuperação não foi reprodutível em pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar, utilizando três manobras consecutivas de tosse, em um segundo protótipo desenvolvido pelos autores.

Nardell, em editorial a respeito deste assunto, comenta que as gotículas que carregam o agente transmissor da tuberculose permanecem um mistério e que muito pouco ainda se sabe sobre a aerobiologia desta doença. Sabe-se que, experimentalmente, pode-se ge-

rar grandes quantidades do agente e recuperá-lo em cultura, porém capturar aqueles aerossóis que são naturalmente eliminados por pacientes bacilíferos ainda não foi possível.⁹

Warren e colaboradores descreveram que um mínimo de cinco mililitros de escarro é necessário para melhorar a sensibilidade da baciloscopia para a identificação do *M. tuberculosis*. Isto ocorre devido à maior concentração do bacilo em amostras de maior volume.¹⁰ A pequena quantidade de bacilos eliminados em aerossóis gerados pela tosse pode ser responsável pelos resultados negativos aqui descritos. Talvez um maior tempo de coleta, como o que aconteceu com o primeiro protótipo testado, possa gerar maior número de partículas e, portanto, melhorar a sensibilidade da técnica.

Fennely e colaboradores desenvolveram um método para a cultura de *M. tuberculosis* em aerossóis gerados pela tosse. Os pacientes tossiam em uma câmara, por cinco minutos, em duas sessões. Vinte e cinco por cento dos pacientes foram positivos, em relação aos positivos na baciloscopia. Nesta técnica, a recuperação ocorreu após a semeadura e crescimento em cultura, o que, sabidamente, amplia a sensibilidade na recuperação dos bacilos. Mesmo com esta estratégia, somente um quarto dos pacientes teve o material recuperado.⁷ Neste trabalho, não realizamos cultura prévia do material coletado, o que talvez aumentasse o rendimento; porém, tal procedimento retarda, sobremaneira, o diagnóstico, visto que o crescimento deste microorganismo é lento.

Behr e colaboradores verificaram que a baciloscopia positiva identifica a maioria dos pacientes com potencial de infectar outras pessoas; porém, pacientes com baciloscopia negativa e cultura positiva são responsáveis por 17% da transmissão de tuberculose.¹¹ A recuperação de *M. tuberculosis* em aerossóis seria um grande avanço no diagnóstico rápido deste grupo específico de pacientes, sem a necessidade de aguardar o crescimento em cultura. O resultado do primeiro protótipo utilizado, com tempo maior de exposição, mostra-se promissor neste sentido.

Guio e colaboradores demonstraram que os cartões de FTA analisados por PCR têm como vantagens a coleta, o transporte e o processamento das amostras de escarro. O material bacilar permanece, por seis meses, no cartão e a análise por PCR é extremamente rápida, além de apresentar maior sensibilidade (10² micobactéria/mL) e especificidade igual à baciloscopia. O estudo orienta a análise da parte purulenta do material, por existirem mais partículas.¹² Comparando o protótipo analisado com este estudo feito em amostras de escarro, pode-se inferir que o material obtido com três manobras de tosse pode ter sido insuficiente, mesmo os aerossóis sendo a via natural de transmissão da doença. A intensidade ou o número de tossidas para captura de partículas pode ser significativa, visto que o protótipo testado, com oito horas de exposição,

resultou positivo. Talvez os aerossóis gerados por três movimentos de tosse não tenham sido suficientes para se obter material da área das vias aéreas inferiores, onde havia maior concentração bacilar.

Wan e colaboradores realizaram cultura no ar filtrado de ambiente hospitalar, por no mínimo seis horas, através de uma membrana, e analisaram o material por PCR.¹³ O método de filtragem mostrou-se eficaz em detectar *M. tuberculosis*, resultado este também demonstrado por outros autores.¹⁴ Este trabalho corrobora a hipótese que o tempo de contato é fator primordial para o sucesso do protótipo, o que foi observado na primeira etapa do trabalho.

Outra possibilidade para explicar o insucesso do segundo protótipo pode ser a parte que fica em contato com a boca do paciente, muito ampla no segundo, permitindo a fuga do material aerossolizado, fato este minimizado no primeiro protótipo testado.

REFERÊNCIAS:

1. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. J Bras Pneumol 2004;30(Supl 1):S1-S57.
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Control. Report 2004.
3. World Health Organization. Epidemiological status of Tuberculosis (Region of Americas) 2004.
4. Kritski AL, Conde MB, Muzzy de Souza GR. Tuberculose: do ambulatório à enfermaria. 2.a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000. A terceira edição é de 2005
5. Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.
6. Comparison of sputum induction with fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis. Experience at an AIDS reference center in Rio de Janeiro, Brazil. Am J Resp Crit Care Med 2000;62(6):2238-40.
7. Fennelly KP, Martyny JW, Fulton KE, Orme IM, Cave DM, Heifets LB. Cough-generated aerosols of Mycobacterium tuberculosis. A new method to study infectiousness. Am J Respir Crit Care Med 2004;169:604-9.
8. Siripattanapipong S, Worapong J, Mungthin M, Leelayoova S, Tan-ariya P. Genotypic study of Pneumocystis jiroveci in human immunodeficiency virus-positive patients in Thailand. J Clin Microbiol 2005;43:2104-10.
9. Nardell EA. Catching droplet nuclei. Am J Respir Crit Care Med 2004; 169:553-4.
10. Warren JR, Bhattacharya M, Almeida KNF, Trakas K, Peterson LS. A minimum 5.0 ml of sputum improves the sensitivity of acid-fast smear for Mycobacterium tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1559-62.
11. Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Leon AP, Daley CL, Small PM. Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients smear-negative for acid-fast bacilli. Lancet 1999;353:444-9.
12. Guio H, Okayama H, Ashino Y, Saitoh H, Xiao P, Miki M, Yoshihara N, Nakanowatari S, Hattori T. Method for efficient storage and transportation of sputum specimens for molecular testing of tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2006;10:906-10.
13. Wan GH, Lu SC, Tsai YH. Polymerase chain reaction used for the detection of airborne Mycobacterium tuberculosis in health care settings. Am J Infect Control 2004;32:17-21.
14. Mastorides SM, Oehler RL, Greene JN, Sinnot IV JT, Kranik M, Sandin RL. The detection of airborne Mycobacterium membrane air sampling and polymerase chain reaction. Chest 1999;115:19-25.

A escassez de estudos sobre a recuperação de partículas em material gerado por aerossóis estimula a continuidade de pesquisa nesta área.

Devem ser realizadas alterações no protótipo para a coleta da amostra, objetivando a otimização do tempo de contato com o paciente e a determinação de sua capacidade diagnóstica em indivíduos bacilíferos e não-bacilíferos.

A recuperação do bacilo no primeiro protótipo confirma a possibilidade de reprodução dos resultados e a efetividade do cartão FTA e da PCR utilizados com este intento.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração do médico pneumologista do Centro de Atendimento Especializado em Saúde (CAES) em Tubarão (SC), Dr. Adilson Medeiros dos Santos.