

## **Tuberculose - Nota Laboratorial**

Amadu Djaló, estudante do 6º ano do mestrado integrado em medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra (FMUC)

### **Resumo**

De acordo com relatórios da organização mundial de saúde (OMS), a tuberculose ainda é uma doença endémica em África e ainda está longe de controlo na Europa, principalmente nos países de leste. Para oferecer outra possibilidade de diagnóstico, foi feita uma tentativa de identificação do DNA do *mycobacterium tuberculosis* (BK) em tecido fixado em formol e incluído em parafina. Uma pequena série de cinco casos com identificação do BK em biópsias de tecido fresco foi utilizada para comparar com os mesmos procedimentos aplicados em biópsias cirúrgicas de gânglios linfáticos, pleura, pericárdio e rim com o diagnóstico histopatológico de tuberculose e sarcoidose (um caso). O teste GenoQuick® MTB foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante. Dos cinco casos, apenas um tinha DNA do BK, apesar de em todos os casos a quantidade de DNA obtida era suficiente para ser submetida à identificação do BK. O presente estudo foi a primeira tentativa de desenvolver a metodologia exploratória e revelou ser útil na rotina diária quando os doentes necessitam de confirmação diagnóstica depois de discordância entre a clínica e o laboratório. Um maior número de casos poderia ajudar a especificidade dos procedimentos laboratoriais.

**Palavras-chave:** GenoQuick® MTB; tuberculose; *mycobacterium tuberculosis*(BK); DNA; tecido fresco; tecido fixado em formol e incluído em parafina.

### **Tuberculosis- Laboratory *post-scriptum***

#### **Abstract**

According with the World Health Organization (WHO) reports, tuberculosis is still an endemic disease in África and still far from control in Europe, mainly in eastern countries. To offer another possible resource for diagnosis, an attempt to identify *mycobacterium tuberculosis* (BK) DNA in formalin-fixed paraffin embedded tissue was performed. A small series of five cases with BK identification in fresh tissue biopsies was used to compare with the same procedures applied in surgical biopsies of lymph nodes, pleura, pericardium and kidney with the histopathological diagnosis of tuberculosis and sarcoidosis (one case). The GenoQuick® MTB test was applied according with the manufacturer instructions. From the five cases, only one had BK DNA, although in all cases, the content of DNA obtained was fair to be submitted to the BK identification. The actual study was a first attempt to develop the explored methodology and revealed to be useful in daily routine when patients need confirmation of diagnosis after lab and clinical discordance. A larger number of cases would support specificity of lab used procedures.

**Keywords:** GenoQuick® MTB; tuberculosis; *mycobacterium tuberculosis*(BK); DNA; fresh tissue; formalin-fixed paraffin embedded tissue.

#### **Introdução**

A tuberculose (TB) é a doença micobacteriana humana clássica e é causada pelo *mycobacterium tuberculosis*. Trata-se de um bacilo aeróbio, imóvel e fracamente gram-positivo, descoberto em 1882 por Robert Koch sendo por isso conhecido também por bacilo de Koch (BK).

O *Mycobacterium tuberculosis* possui uma parede celular complexa e rica em lípidos, sendo responsável por muitas das propriedades características da bactéria nomeadamente: ácido-alcoól resistência, resistência a detergentes, resistência a corantes usuais de laboratório, resistência a antibióticos anti-bacterianos comuns e crescimento lento ( três a oito semanas de incubação). Uma vez corados os bacilos não podem ser descorados com soluções ácidas, daí a designação de bacilos ácido-resistentes.

Na membrana externa da parede celular desta bactéria existem cadeias peptídicas que constituem antígenos biologicamente importantes, estimulando a resposta imunológica celular do paciente, surgindo assim a infecção. A Preparação desses derivados proteicos parcialmente purificados( derivado proteico purificado ou PPD) é utilizada nos testes cutâneos( teste de tuberculina) para caracterizar a exposição ao *Mycobacterium tuberculosis*. O BK possui um DNA com alto teor de guanosina e citosina, outra característica que permite distingui-lo de outras bactérias.

O BK é transmitido por contacto íntimo de pessoa a pessoa através de inalação de aerossóis infecciosos que contêm um a três bacilos de tuberculose que se propagam então até as vias aéreas terminais estabelecendo a infecção. A tuberculose resulta principalmente da resposta imunológica do hospedeiro a infecção. Nenhuma toxina ou enzima micobacteriana conhecida foi associada a destruição tecidual.

Na maioria dos indivíduos infectados naturalmente com imunocompetência, a multiplicação das micobactérias cessa dentro de três a seis semanas após a exposição ao microrganismo. Aproximadamente 5% dos indivíduos expostos evoluem para tuberculose activa dentro de dois anos, enquanto 5 a 10% irão desenvolver a doença posteriormente na vida( tuberculose secundária e terciária). A probabilidade de evolução da infecção para tuberculose activa depende da dose infecciosa e da competência imunológica do doente. Por exemplo, a tuberculose activa desenvolve-se em aproximadamente 10% dos doentes infectados por HIV dentro de um ano após a exposição, em comparação com um risco de 10% de doença durante a vida dos doentes não infectados por HIV. Nos doentes infectados por HIV, a tuberculose é normalmente a primeira infecção a revelar-se.

As populações com maior risco de contrair a tuberculose são os doentes imunocomprometidos (particularmente os infectados por HIV), usuários de drogas e de álcool, população de rua, prisioneiros e indivíduos expostos a doentes.

A doença é diagnosticada pela clínica e confirmada por evidência radiográfica de doença pulmonar, teste cutâneo positivo e detecção laboratorial de micobactérias em cultura, microscopia ou por reacção em cadeia da polimerase (PCR), a partir do DNA bacteriano.

A tuberculose continua sendo um grande problema de saúde a nível mundial, tanto que a organização mundial de saúde (OMS) declarou a doença como uma emergência de saúde pública mundial desde 1993.

A tuberculose é considerada a segunda maior causa de morte por doença infecciosa em todo o mundo a seguir a HIV/SIDA. O surgimento e disseminação da SIDA a partir de 1981 mudaram o perfil epidemiológico da tuberculose, resultando no aumento da morbidade e mortalidade em todo o mundo.

Segundo o relatório da OMS sobre a doença publicado em 2012, houve quase nove milhões de novos casos de tuberculose em 2011 e 1.4 milhão de mortes, das quais 430 000 foram por coinfeção tuberculose-HIV.

Na região europeia da OMS, os estados-membros de leste apresentam taxas de notificação da TB muito mais elevadas que os da Europa ocidental.

A região africana contribui com um peso da TB desproporcionalmente alto a nível global. Em 2005, a OMS estimou a incidência de todas as formas de tuberculose na África, em 343/100 000 habitantes e a incidência da forma pulmonar bacilífera em 147/100 000 habitantes. A prevalência foi estimada em 511/100 000 habitantes e a mortalidade em 74/100 000 habitantes.

Dos 22 países responsáveis por 80% do peso mundial da TB, os chamados países com o elevado peso da doença (the high burden countries, HBCs), nove são países africanos. Dos quinze países com a mais alta incidência estimada da TB per capita no mundo, doze estão em África.

A região da comunidade para o desenvolvimento do sul da África (SADC) é responsável por metade (50%) de todos os casos de TB na região africana. Cinco dos seus países (RD Congo, Moçambique, África do Sul, Tanzânia e Zimbábue) fazem parte dos 22 países com o elevado peso da doença (HBCs).

Segundo a OMS a África é responsável por 82% dos casos de coinfeção tuberculose-HIV no mundo.

Este estudo teve como objectivo, a detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em tecido fixado em formaldeído e incluído em parafina usando o kit GenoQuick<sup>®</sup> MTB (GenoQuick<sup>®</sup> MTB da Hain Lifescience GmbH- Germany).

Pretendeu-se aferir a técnica para os tecidos incluídos em parafina, com o objectivo de recuperar os casos em que não é possível obter tecido fresco, para que ocorra a prescrição do tratamento ao doente. Assim, comparam-se os resultados obtidos pela mesma técnica previamente aplicada em tecido fresco do mesmo doente, com os resultados das amostras em parafina, de onde o DNA foi extraído aplicando o kit QIAAMP DNA Mini Kit. Procedeu-se também à avaliação do diagnóstico morfológico efectuado no desconhecimento do resultado laboratorial.

## **Material e Métodos**

Estudo retrospectivo realizado no Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) e no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC), entre 29 de Maio de 2012 e 18 de Março de 2014. Neste estudo foi utilizado tecido de arquivo e redundante de doentes com diagnóstico clínico e histológico de tuberculose com excepção de um dos casos em que a histologia explicitou o diagnóstico de sarcoidose.

O projecto de investigação cumpriu com rigor, as indicações da comissão de ética da instituição onde decorreu a investigação, para os estudos retrospectivos, em tecido redundante, mantendo assim o anonimato dos doentes e não haverá qualquer interferência do estudo, no curso normal da doença ou no tratamento do doente, em estudo retrospectivo. Foram avaliados cinco casos, cujas amostras de tecido fresco consistiram em: gânglio linfático cervical, pericárdio e pleura parietal, gânglio mediastínico, tecido pulmonar e rim e ureter.

A colheita das amostras dos cinco doentes com suspeita clínica de tuberculose foi feita no Serviço de Cirurgia Córdio-Torácica e enviadas depois para a Anatomia Patológica e, uma parte deste tecido fresco de todos os doentes seguiu para o Serviço de Patologia Clínica da mesma instituição onde decorreu o nosso estudo (CHUC). Ali, as amostras de tecido fresco foram processadas e submetidas ao teste GenoQuick<sup>®</sup> MTB (ver adiante).

No Serviço de Anatomia Patológica, a outra parte das amostras dos mesmos cinco doentes em estudo, fixadas em formol e incluídas em parafina, seguiu processamento para lâminas de hematoxilina e eosina que permitiram fazer o diagnóstico histológico de tuberculose com excepção num caso que foi relatado como sarcoidose já referido anteriormente (tabela 1).

Por fim procedeu-se a extracção de DNA das amostras em parafina no Instituto de Anatomia Patológica-patologia molecular( IAP-PM). Este DNA foi posteriormente enviado ao Serviço de Patologia Clínica para a execução do teste molecular, GenoQuick<sup>®</sup> MTB com o objectivo de comparar os resultados deste teste com os obtidos utilizando tecido fresco, o que constituiu o objectivo do presente estudo.

**TABELA 1.** Tipos de amostra e diagnóstico Histopatológico dos doentes estudados

Caso	Género	Idade	Produto enviado à Anatomia Patológica	Diagnóstico Histológico
1 H06-00266 <sup>a</sup> H11-09115	Feminino	64 anos	Gânglio cervical	Linfadenite granulomatosa (sarcoidose)
2 H11-04470	Masculino	87 anos	Pericárdio e pleura parietal	Pericardite tuberculosa
3 H12-05323	Feminino	75 anos	Gânglio mediastínico	Provável tuberculose
4 H12-13575	Masculino	62 anos	Tecido pulmonar	Provável tuberculose
5 H12-13892	Masculino	83 anos	Rim e ureter	Provável tuberculose renal

<sup>a</sup> A doente foi submetida a biopsia de gânglio cervical em dois tempos diferentes.

Antes de serem analisadas pelo referido teste de genética molecular, as amostras dos cinco doentes foram submetidas à homogeneização e descontaminação com o objectivo de as fluidificar e destruir a flora microbiana inespecífica que eventualmente possam conter. No entanto, algumas amostras por serem normalmente estéreis e fluídas não necessitam de homogeneização (Ex: Lcr e alguns líquidos pleurais).

No laboratório de Patologia Clínica dos CHUC, utiliza-se o método da N-acetil-L-cisteína-Hidroxido de sódio (NALC-NaOH) para a homogeneização das amostras (kit BBL<sup>™</sup> MYCOPREP<sup>™</sup>, 5- 10 ml adicionados à igual quantidade da amostra no tubo para a pesquisa do BK). Este kit é constituído por água purificada, três reagentes (NaOH, NALC e citrato de sódio) e ainda inclui tampão fosfato.

O hidróxido de sódio( NaOH) a 2% é um agente mucolítico e descontaminante e está combinado com N-acetil-L-cisteína (NALC), um mucolítico. O NaOH naquela concentração é tóxico quer para os contaminantes quer para algumas micobactérias. Mas a adição da amostra permite diluir a concentração para 1% que é menos tóxica para as micobactérias. O citrato de sódio liga-se aos iões de metais pesados que possam existir na amostra e que podem inactivar NALC.

O tampão fosfato com PH 6.8 permite diminuir ou parar a acção da solução de homogeneização NALC- NAOH antes da centrifugação a 3000 rpm durante quinze minutos ( concentração).

Após a centrifugação obtém-se o sedimento. Além das amostras descontaminadas que foram utilizadas na realização do nosso teste GenoQuick<sup>®</sup> MTB, foram inoculados os meios de cultura,

realizados esfregaços e o restante sedimento foi congelado( guardado).

Após a homogeneização, as amostras dos doentes já descontaminadas foram então submetidas ao ensaio de GenoQuick<sup>®</sup> MTB que compreende três etapas: extracção do DNA das amostras, amplificação multiplex com primers diferentemente marcados( PCR) e detecção numa tira marcada com ouro. O produto da amplificação é qualitativamente detectado numa tira. Primeiro, os fragmentos de DNA replicados por PCR ( amplicons) de cadeia única, hibridizam com sondas específicas incluídas na mistura primer/nucleótido. Este complexo liga-se selectivamente às bandas de teste na tira e é visualizado por uma marcação ouro. O procedimento completo dura aproximadamente três horas sendo os resultados conhecidos no próprio dia.

Primeira etapa: Extracção do DNA- é usado o kit GenoLyse<sup>®</sup>( kit de extracção de DNA para 96 amostras, Ref. nº 51610, extracção via lise alcalina), um material não fornecido no kit GenoQuick<sup>®</sup> MTB. A área de trabalho tem que estar livre de DNA amplificado. Esta etapa do teste dura 30 minutos.

Segunda etapa: Amplificação do DNA( PCR)- prepara-se a mistura de amplificação(45 ul) numa sala livre de DNA. A amostra de DNA ( 5 ul de solução de DNA) deve ser adicionada numa área separada. A reacção de amplificação é catalizada pela enzima DNA polimerase termoestável com tampão ( enzima “hot start “, taxa de extensão: 2-4 kb/min a 72°C, semi-vida: 10 min a 97°C, 60 min a 94°C, eficiência de amplificação:  $>10^5$  vezes e em concentração de 0,2 ul= 1U) não fornecida com o kit. Além das amostras analisadas, preparam-se também em paralelo, tubos de PCR com amostras de controlo de contaminação que contêm por exemplo, 5 ul de água em vez da solução de DNA, contendo portanto todos os reagentes da mistura excepto a solução de DNA. Este passo do teste é o mais demorado, durando aproximadamente 2 horas.

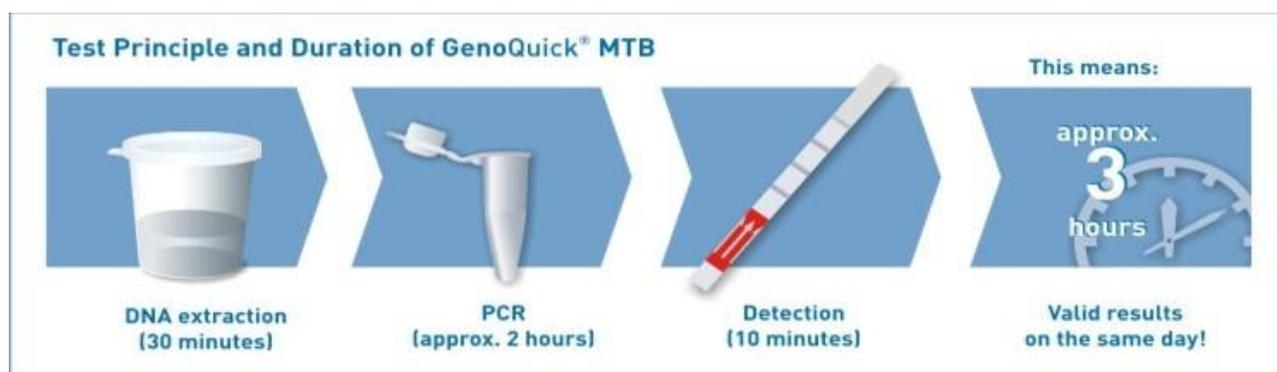
Terceira etapa: Detecção- imediatamente antes de iniciar a detecção, remove-se uma tira para cada amostra do tubo e marca-se com um lápis na área do rótulo. Adiciona-se 10 ul dos amplicons hibridizados a um tubo com 100 ul de tampão de corrida (RB) e mistura-se bem pipetando para cima e para baixo. A cor do RB muda para amarelo pálido após a adição dos amplicons.

Coloca-se então a tira com a matriz de ouro virada para baixo( setas apontando para cima) no respectivo tubo e incuba-se durante 10 minutos a temperatura ambiente. Findo o tempo de incubação, retiram-se as tiras dos tubos e regista-se os resultados numa ficha de avaliação fornecida. Após o registo dos resultados as tiras e os tubos com tampão restante devem ser descartados num contentor com 1,5% de solução fresca de Hipoclorito de sódio uma vez que as tiras acarretam riscos de contaminação. A área de trabalho deve ser limpa com a mesma concentração de Hipoclorito de sódio e passar por água. Esta etapa do ensaio tem a duração de 10 minutos( Fig. 1).

Por forma a validar o desempenho correcto do teste e o funcionamento adequado dos componentes do kit, cada tira possui duas zonas de controlo:

- uma zona de controlo do conjugado, conferindo a ligação do conjugado na tira.
- Uma zona de controlo de amplificação para verificar se a reacção de amplificação foi ou não correcta.

De recordar que avaliamos em tempos diferentes dois tipos de amostras dos cinco doentes incluídos no estudo, nomeadamente amostras de tecido fresco e amostras de tecido em parafina.



**Figura 1.** As três etapas, a duração de cada e o tempo total estimado do teste GenoQuick® MTB.

Fonte: <http://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/genoquick-mtb.html>

## Resultados

Do total de cinco casos estudados, para as amostras de tecido fresco, o teste GenoQuick® MTB foi positivo em todos eles. Para as amostras de tecidos fixados em formaldeído e incluídos em parafina dos mesmos doentes, o referido teste foi positivo em apenas um caso que corresponde ao tecido de pericárdio e pleura parietal( caso 2, tabela 1) conforme ilustrado.

**TABELA 2.** Resultados do teste GenoQuick® MTB e do exame histológico

Caso	Diagnóstico Histológico	Diagnóstico GenoQuick® MTB ( Tecido fresco)	Diagnóstico GenoQuick® MTB ( Tecido parafina)
1	Linfadenite granulomatosa (sarcoidose)	+	-
2	Pericardite tuberculosa	+	+
3	Provável tuberculose	+	-
4	Provável tuberculose	+	-
5	Provável tuberculose renal	+	-

Não foi feito acompanhamento do resultado terapêutico dos doentes, uma vez que não tínhamos este indicador nos objectivos do trabalho.

## Discussão

Após o desenvolvimento da estratégia DOTS( tratamento de curta duração observado directamente) em meados de 1990, a OMS estabeleceu as seguintes metas para 2005: detecção de 70% dos casos estimados de tuberculose pulmonar( os mais infecciosos) e tratamento com sucesso de 85% desses casos.

A OMS lançou a estratégia stop TB em 2006 com novas metas para 2015 como parte dos objectivos do desenvolvimento do milénio. Estas metas são a redução da incidência da tuberculose e redução para metade das taxas de prevalência e de mortalidade em comparação com os seus níveis em 1990.

Na europa, de acordo com o relatório de 2012 lançado em conjunto pelo centro europeu de

prevenção e controlo das doenças (ECDC), gabinete regional da OMS para a Europa (OMS/EURO) e ainda pelo projecto Euro TB, há uma redução da incidência de TB mas a TB multirresistente (MDR TB) tem vindo a tornar-se uma importante preocupação. A prevalência de MDR TB entre os novos casos de TB na região aumentou de 12% para 13,7% no período de 2009-2010. Os casos de MDR TB entre os doentes tratados anteriormente aumentaram igualmente de 47% para 48,7% entre 2008 e 2010. A região comunicou mais de 29 000 doentes com MDR TB.

A maioria das notificações de co-infecção TB-HIV (85,6%) provinha da zona leste da região e a percentagem total ao nível da região de indivíduos infectados por HIV entre os casos de TB notificados aumentou de 3,4% em 2008 para 5,5% em 2010, num total de cerca de 16 000 indivíduos.

A Guiné-Bissau a TB não apresenta bons indicadores de saúde, assim como na maioria dos países em vias de desenvolvimento. Em 1986 foi instituído o programa nacional de luta contra a tuberculose com a ajuda da associação italiana, Amici di Raoul Follereau, de Bologna, que foi unificado ao programa de luta contra a lepra, constituindo o programa nacional de luta contra a lepra e tuberculose (PNLT).

Em Maio de 2003, a Guiné-Bissau elaborou um plano estratégico nacional de luta contra a TB para ser executado no período 2004-2008, reformulando assim o PNL. Os objectivos deste plano eram: Reduzir a morbidade e mortalidade da doença, prevenir o aparecimento de resistência aos medicamentos, curar 85% e diagnosticar 70% dos casos de TB com baciloscopia positiva e consolidar a estratégia DOTS que em 2003 era praticada em apenas 4% das unidades de saúde.

O número de casos de TB manteve-se estável no período de 2000 (1959 casos) a 2005 (1888 casos). A percentagem de casos pulmonares variou de 96 a 98,8%, dos quais 55% eram bacilíferos. Em 2005 o coeficiente de prevalência foi de 142,4/100 000, o de incidência 131,3/100 000 e o de mortalidade, 16,8/100 000 habitantes. A região da capital (Bissau) tinha o maior número de casos. Entre 2000 e 2005 foram diagnosticados poucos casos de TB extrapulmonar (3,1%) devido provavelmente a limitação de recursos laboratoriais e/ou a não familiarização dos profissionais com esta forma clínica.

De acordo com estimativas da OMS para o país, em 2011 a taxa de mortalidade ( excluindo casos de coinfecção TB-HIV) foi de 24/100 000, a de prevalência (incluindo coinfecção TB-HIV) foi de 268/100 000 e a taxa de incidência ( incluindo coinfecção TB-HIV) situou-se em 238/100 000 habitantes. O número total de novos casos notificados no referido ano foi 1 937 casos.

Neste estudo, está evidente uma discrepância entre os resultados do ensaio em amostras de tecido fresco (positividade em todos os casos) e os resultados do mesmo teste usando as amostras em parafina (um caso positivo e quatro casos negativos) dos mesmos doentes.

Vários autores recomendaram a aplicação de métodos moleculares de diagnóstico de tuberculose, utilizando tecidos fixados em formol e incluídos em parafina (TFFIP) na medida em que este material pode ser arquivado e constitui uma importante fonte para os estudos prospectivos e retrospectivos. No entanto, existem dificuldades na obtenção de bons resultados usando PCR neste material uma vez que a eficácia da PCR nestas amostras (TFFIP) está dependente de vários factores que afectam a integridade dos tecidos, nomeadamente o protocolo de fixação e inclusão, a idade do bloco de parafina e a presença de inibidores endógenos ou exógenos da reacção.

Denise Barcelos *et al*<sup>2</sup> avaliaram os efeitos de diferentes protocolos de fixação e inclusão em parafina e do tipo de fixador sobre a PCR, utilizando para o efeito fragmentos de pulmão e baço de um doente que tinha falecido com o diagnóstico de tuberculose miliar. Os fragmentos de tecido foram fixados por um período de quatro a 48 horas (4h, 6h, 12h, 24h ou 48h), utilizando formol a 10% não tamponado ou formol com tampão (tampão fosfato com pH 7.0). Os fragmentos foram incluídos então em parafina pura ou parafina misturada com cera de abelha (a cera de abelha facilita

os cortes das amostras em parafina). Em seguida as amostras foram submetidas a PCR para amplificação do gene da beta-actina humana e separadamente para amplificação da sequência de inserção IS6110, específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A detecção dos produtos da amplificação foi realizada em gel de agarose após electroforese e após hibridização com sondas específicas.

A PCR do gene da beta-actina humana produziu amplicons em todas as 40 amostras testadas, confirmando a presença de DNA amplificável em todas as amostras. Observou-se que os diferentes tempos de fixação usados (4h, 6h, 12h, 24h e 48h) não influenciaram os resultados da amplificação. Resultados semelhantes foram obtidos por GREER *et al*<sup>7</sup> que avaliaram diferentes tempos de fixação (1h, 4h e 24h) e por JOHANSEN *et al*<sup>16</sup> (16h-18h). No entanto INOUE *et al*<sup>14</sup> concluíram que os tecidos devem ser imediatamente fixados durante um dia para se manterem viáveis a PCR de fragmentos de até 200 pb.

Em relação ao fixador, o formol tamponado obteve melhores resultados do que o formol 10% sem tampão quer nas amostras do pulmão quer nas do baço. Assim a fixação com formol não tamponado produziu resultados positivos em 50% das amostras do pulmão e em 50% das amostras do baço.

Ao utilizar o formol com tampão fosfato a positividade sobe para 60% com o pulmão e 70% das amostras do baço, sugerindo que o formol 10% não tamponado pode ser inadequado para fixação de amostras que serão submetidas a testes de biologia molecular. Contraditoriamente JOHANSEN *et al*<sup>16</sup> obtiveram bons resultados com o uso de formol 10% não tamponado que pode dever-se a qualidade da água utilizada na diluição do formol ou outros factores desconhecidos que possam ter contribuído para estes resultados discrepantes.

Verificou-se que a presença da cera de abelha influenciou negativamente a amplificação da sequência de inserção IS6110 do BK. Isto foi observado com os tecidos do pulmão em que amplicons foram detectados em 20% das amostras incluídas em parafina misturada com cera de abelha contra 90% de amostras embebidas em parafina pura. No baço os resultados foram idênticos com a parafina misturada com cera de abelha e parafina pura.

Após a hibridização, o numero de casos positivos foi maior nas amostras do baço do que as do pulmão, o que pode dever-se a organização histológica do pulmão nomeadamente uma celularidade esparsa que pode contribuir para a produção de quantidade insuficiente de DNA micobacteriano disponível. Quando os factores que produzem efeito negativo na PCR foram combinados isto é, amostras fixadas em formol a 10% não tamponado, incluídas em parafina misturada com cera de abelha e obtidas do pulmão, a positividade da PCR-IS6110 foi nula. Este resultado indica que estes factores inibitórios afectam profundamente a detecção de BK nas amostras em parafina e pode explicar os resultados que obtivemos no nosso ensaio GenoQuick<sup>®</sup> MTB em que quatro das cinco amostras fixadas em formol e incluídas em parafina dos nossos doentes foram negativas para o BK.

Apesar dos processos de fixação em formol e inclusão em parafina possibilitarem a conservação e arquivo dos tecidos, devem ser feitos esforços por parte dos laboratórios de Patologia para controlar os factores inibitórios acima referidos por forma a pôr em prática técnicas moleculares eficazes no diagnóstico da tuberculose.

Assim, os doentes são submetidos a terapêutica antituberculosa com base nos resultados laboratoriais. Naturalmente que para a metodologia que explorámos o tecido fresco é mais rentável, uma vez que o processamento para parafina pode destruir o DNA, principalmente se a fixação em formol não for imediata. O trabalho realizado, com este número muito reduzido de casos, estabeleceu uma base de trabalho para o recurso ao tecido incluído em parafina, quando não existir tecido fresco e for necessário estabelecer o tratamento com tuberculostáticos, se a clínica for compatível e indicadora de tuberculose.

## **Bibliografia Consultada**

1. Raquel V. B. Piller. Epidemiologia da tuberculose. Pulmão RJ 2012;21(1):4-9.
2. WHO. Global Tuberculosis Report 2012; 1-5.
3. ECDC. vigilância e monitorização da tuberculose na Europa 2012; 1-4.
4. Ministério da Saúde de Moçambique. Situação da tuberculose no mundo. Relatório 2009.
5. Cristóvão Manjuba, Péricles Alves Nogueira, Regina Maura Cabral de Melo Abrahão. A situação epidemiológica da tuberculose na República da Guiné-Bissau, 2000-2005. Rev Bras Epidemiol 2008; 11(1): 97-105.
6. Laboratório de Micobactérias. Guia de apoio ao estágio. Mel Campos Coroa// 2001.
7. Serviço de Patologia Clínica dos HUC. GenoQuick<sup>®</sup> MTB: Teste rápido de genética molecular para a detecção directa do Complexo *mycobacterium tuberculosis* a partir de amostras dos pacientes.
8. Raquel Moure, Miriam Torres, Rogelio Martín, Fernando Alcaide. Direct detection of mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples by a molecular method based on GenoQuick technology. Journal of clinical microbiology p. 2089-2091.
9. Denise Barcelos, Marcello F. Franco, Sylvia Cardoso Leão. Effects of tissue handling and processing steps on PCR for detection of mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded samples. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo vol.50 no.6 São Paulo Novembro/Dezembro 2008.

