

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública

Rosana de Albuquerque Montenegro

**AVALIAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO (RNAm) DO
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMO MARCADOR DE
CURA EM PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR**

**Recife
2012**

ROSANA DE ALBUQUERQUE MONTENEGRO

**AVALIAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO (RNAm) DO MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS COMO MARCADOR DE CURA EM PACIENTES COM
TUBERCULOSE PULMONAR.**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Saúde Pública do
Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz
para a obtenção do grau de doutor em
Ciências.

Orientadores: Dra. Haiana Charifker Schindler

Dr. Fábio Lopes de Melo

Recife
2012

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

M777a Montenegro, Rosana de Albuquerque.
Avaliação do RNA mensageiro (RNAm) do
Mycobacterium tuberculosis como marcador de cura em
pacientes com tuberculose pulmonar / Rosana de
Albuquerque Montenegro. - Recife: s.n, 2011.
92 p. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadores: Haiana Charifker Schindler, Fábio
Lopes de Melo.

1. Tuberculose - diagnóstico. 2. Tuberculose -
terapia. 3. Reação em Cadeia da Polimerase Via
Transcriptase Reversa. I. Schindler, Haiana Charifker.
II. Melo, Fábio Lopes de. II. Título.

CDU 616-002.5

ROSANA DE ALBUQUERQUE MONTENEGRO

**AVALIAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO (RNAm) DO MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS COMO MARCADOR DE CURA EM PACIENTES COM
TUBERCULOSE PULMONAR.**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Saúde Pública do
Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz
para a obtenção do grau de doutor em
Ciências.

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

PhD Haiana Charifker Schindler (Orientadora)
CPqAM/FIOCRUZ

PhD Milena de Paiva Cavalcanti (Membro interno)
CPqAM/FIOCRUZ

PhD Virgínia Maria Barros de Lorena (Membro externo)
CPqAM/FIOCRUZ

PhD Cristiane Moutinho Lagos de Melo (Membro externo)
CPqAM/FIOCRUZ

PhD Paulo Sérgio Ramos de Araújo (Membro externo)
CPqAM/FIOCRUZ

*Dedico este trabalho aos meus pais,
ao meu esposo Antônio e a
minha filha Ana Beatriz.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência e por descobrir a cada dia Sua presença em minhas conquistas.

Aos meus pais pelo amor incondicional, por sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida, pelo apoio, e principalmente por reafirmarem que caráter e educação são as maiores heranças que se pode deixar para um filho. Por vocês o mais sublime e indescritível amor!

Aos meus irmãos, Simone, Ana Cristina, Humberto e Ricardo pelo amor e carinho que nos une, pelas palavras de apoio e força espiritual que faz de vocês pessoas iluminadas.

Ao meu amor Antonio por incentivar os meus estudos, pela compreensão pelos dias que passei dedicada quase exclusivamente a tese e que supriu a minha ausência junto a Ana Beatriz, e também por estar sempre ao meu lado quando eu mais preciso. Meu eterno agradecimento!

A minha filha Ana Beatriz que chegou na minha vida em pleno doutorado para me dar força e energia, e me ensinar cotidianamente, o significado do amor.

À minha orientadora, Dra. Haiana Charifker Schindler, que me iniciou no “mundo” científico, a quem eu admiro pela sua competência como cientista e pediatra. Agradeço pela amizade, respeito, confiança, dedicação e apoio essenciais ao desenvolvimento dessa pesquisa. Muito obrigada pelos grandes ensinamentos e sincera dedicação! Minha eterna gratidão.

À minha amiga e companheira Lílian Maria Lapa Montenegro, pela ajuda fundamental nos contatos com os médicos dos Hospitais, pela sua dedicação à pesquisa, assistência, otimismo, e convívio saudável e alegre, sobretudo pela amizade que se estabeleceu ao longo de vários anos de convivência. Muito obrigada!

Ao meu amigo e co-orientador Fábio Lopes de Melo pela colaboração e contribuição científica essenciais na execução da tese. Pelo apoio recebido e pela eterna amizade.

A brilhante “Equipe das Tuberculetes” que compõe o Laboratório de Imunoepidemiologia: Andrea Santos Lima, André Nascimento, Fabiana Fulco, Gabriela Guedes, Heidi Lacerda, Juliana Figueirêdo, Laís Lira, Márcia Schneider, Marcela Salazar. A união, competência e ajuda de vocês foram fundamentais na realização desta tese, além dos momentos de alegria e descontração proporcionados. Minha eterna gratidão!

A Juliana Falcão pela importante colaboração na realização das entrevistas e coleta das amostras, sempre realizadas com muito carinho e presteza aos pacientes. Saudades!

A estudante de Iniciação Científica do Lab. Imunoepidemiologia Klarissa Miranda Guarines, pelo empenho, disponibilidade em ajudar e contribuição essencial na realização das técnicas de RT-qPCR.

Às amigas e “agregadas” das Tuberculetes, Neide Xavier e Karla Luna, por cada palavra de consolo, de apoio e incentivo e também pelo carinho e amizade de longas datas.

A amiga e secretária do Departamento de Imunologia Simone Santos pela sua ajuda em todos os momentos que precisei com os procedimentos burocráticos do CPqAM.

Ao amigo Sinval Brandão Filho pela amizade de longas datas, pelo apoio, vibração em todas as conquistas realizadas, e incentivo para que eu continue fazendo parte desta grande família que é o CPqAM/FIOCRUZ.

A Dra. Silvia Montenegro a quem eu tenho enorme respeito e admiração pelo seu profissionalismo, ética e lealdade. Muito obrigada pelo apoio e disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

A Dra. Milena de Paiva Cavalcanti pela constante disponibilidade em ajudar, pelas contribuições científicas importantes e necessárias para execução da parte técnica como também o apoio e carinho recebidos.

Ao Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do Departamento de Imunologia do CPqAM pela ajuda na realização da Subclonagem e por todas as vezes que fui até a sua sala tirar dúvidas e sempre fui bem recebida.

Aos amigos de toda hora, Eduardo Henrique e Roberto Werkhauser, pela força, apoio e pela torcida para que tudo desse certo.

A George Tadeu pela assistência na área estatística, por disponibilizar o seu tempo para atender com atenção e profissionalismo.

A coordenadora da Pós-Graduação do CPqAM Eduarda Cesse a qual tenho muito admiração como pessoa, além de excelente professora. Muito obrigada pela sua compreensão e carinho recebidos durante o período do doutorado.

Agradeço em especial aos membros da banca examinadora, Milena de Paiva Cavalcanti, Virgínia Maria Barros de Lorena, Cristiane Moutinho Lagos de Melo, Paulo Sérgio Ramos de Araújo, pela disposição em contribuir para o engrandecimento desse trabalho.

À Secretaria Acadêmica do CPqAM/FIOCRUZ, principalmente Rivaldete, Ana Paula, Joselice e Adriana.

Aos funcionários da Biblioteca do CPqAM, em especial Mégine, Adagilson e Márcia pelo apoio e colaboração.

A todos que fazem parte do Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ por ter cedido suas instalações para o desenvolvimento deste estudo.

Ao enfermeiro Ricardo Leite do Posto de Saúde Joaquim Cavalcanti pela ajuda na seleção dos pacientes e ter disponibilizado toda a infra-estrutura do seu ambulatório. Agradeço ainda, a toda sua equipe de agente de saúde, fundamentais na busca ativa dos pacientes;

As Diretorias dos Hospitais das Clínicas e Otávio de Freitas pela contribuição na realização desta pesquisa.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro indispensáveis para realização deste trabalho.

A todas as pessoas que me apoiaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

A todos os pacientes que voluntariamente contribuíram para a realização desta tese, em busca de uma melhoria da qualidade de vida e no avanço da ciência.

MONTENEGRO, Rosana de Albuquerque. Avaliação do RNA mensageiro (RNAm) do *Mycobacterium tuberculosis* como marcador de cura em pacientes com tuberculose pulmonar. 2011. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011

RESUMO

A tuberculose (TB) é um dos grandes problemas de saúde pública mundial devido às suas altas taxas de morbimortalidade e índices de transmissão, apesar de existir tratamento e medidas eficazes de controle da doença. O diagnóstico precoce associado a uma terapêutica adequada é essencial para a eficácia dos programas públicos de controle. As técnicas diagnósticas, baciloscopia e cultura, utilizadas de rotina para a detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em amostras clínicas são falhas em sensibilidade e na demora da obtenção dos resultados, respectivamente. A cultura é considerada o método padrão-ouro para avaliar a viabilidade do bacilo em pacientes com tuberculose em vigência de tratamento específico, porém, por ser laboriosa e necessitar de pelo menos 4 semanas para o crescimento do bacilo, dificulta bastante o monitoramento clínico e a resposta do paciente às drogas tuberculostáticas. Neste contexto, os métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos com destaque para a tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) destacando a Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) utilizando o RNA mensageiro que expressa bem a viabilidade bacilar. Neste trabalho foi analisado o desempenho da RT-qPCR utilizando como alvo o gene 85B do *Mycobacterium tuberculosis* na detecção e resposta ao tratamento específico da tuberculose pulmonar. Foi realizada uma padronização com diferentes concentrações dos *primers* e sonda desenhados por Desjardin *et al*, (1999). Construiu-se uma curva padrão de DNA plasmidial gerando um limite de detecção de 10pg/ μ l (7×10^7 cópias/reação), $\epsilon = 106$, $R^2 = 0,98\%$, e $slope = -3,18$. O sistema foi avaliado em 98 pacientes com suspeita de TB pulmonar apresentando uma sensibilidade de 91,07% e especificidade de 97,61%, quando comparado à cultura. Em 56 pacientes com tuberculose pulmonar acompanhados durante 30 dias de tratamento específico verificou-se que a RT-qPCR e a cultura apresentaram uma excelente concordância, tendo sido observado um declínio de bacilos viáveis nos dias 15 e 30 após o início da terapêutica na maioria deles. Desta forma, os resultados encontrados sugerem que a RT-qPCR é uma ferramenta que pode ser utilizada no monitoramento clínico e terapêutico, como sinalizador de resistência bacteriana e indicador do período de transmissibilidade do *M. tuberculosis* em pacientes com TB pulmonar submetidos a tratamento específico.

Palavras chaves: Tuberculose-Diagnóstico, Tuberculose-terapia, Reação em cadeia da Polimerase Via Transcriptase reversa.

MONTENEGRO, Rosana de Albuquerque. Assessment of messenger RNA (mRNA) of *Mycobacterium tuberculosis* as a marker of cure in patients with pulmonary tuberculosis. Thesis (Doctorate in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a major public health problem worldwide due to their high rates of morbidity and mortality and transmission rates, although it has an effective treatment and control of the disease. Early diagnosis combined with appropriate therapy is essential for effective control of public programs. The diagnostic techniques, microscopy and culture, used for routine detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens are lacking in sensitivity and delay in obtaining results, respectively. Culture is considered the gold standard to assess the viability of the bacillus in patients with tuberculosis in the presence of specific treatment, however, being laborious and requires at least 4 weeks for growth of the bacillus, very difficult clinical monitoring and response the patient to antituberculosis drugs. In this context, molecular methods have been developed especially for the technology of polymerase chain reaction (PCR) highlighting the reverse transcription followed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) using the messenger RNA that expresses well bacillus viability. In this work we analyzed the performance of RT-qPCR using gene targeting 85B of *Mycobacterium tuberculosis* detection and response to treatment of pulmonary tuberculosis. Standardization was performed with different concentrations of primers and probe designed by Desjardin et al., (1999). Constructed a standard curve of plasmid DNA generating a detection limit of 10pg/ul (7×10^7 copies / reaction), $\epsilon = 106$, $R^2 = 0.98\%$, and slope = -3.18. The system was evaluated in 98 patients with suspected pulmonary TB presenting a sensitivity of 90.2% and a specificity of 87.2% compared to culture. In 56 patients with pulmonary tuberculosis followed for 30 days in specific treatment it was found that the RT-qPCR and the culture showed an excellent agreement, being a decline of viable bacilli in 15 and 30 days after initiation of therapy in most. Thus, these results suggest that the RT-qPCR is a tool that can be used in clinical and therapeutic monitoring as an indicator of bacterial resistance and indicator of the period of transmissibility of *M. tuberculosis* in patients with pulmonary TB undergoing treatment.

Keywords: Tuberculosis Diagnosis, Tuberculosis therapy, Polymerase Chain Reaction Reverse Transcriptase

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1 -	Ilustração de uma molécula de SYBR Green I entre a dupla fita de DNA	32
Figura 2 -	Curvas de dissociação de um ensaio com Syber Green mostrando uma curva de dissociação de primers específicos e de dímeros de primers	32
Figura 3 -	Sonda com tecnologia TaqMan mostrando numa extremidade um fluoróforo e na outra um quencher.	33
Figura 4 -	PCR em Tempo Real com sonda TaqMan mostrando as etapas da reação	34
Figura 5 -	Interface do <i>software</i> ABI PRISM 7500 SDS (versão 2.0.4) mostrando a curva-padrão do ensaio de quantificação absoluta.	35
Figura 6 -	Curva de amplificação de uma reação de qPCR	36
Figura 7 -	Curva de amplificação de diferentes concentrações dos primers (TB1 e TB2) testadas com amostra de 10pg da curva de diluição do DNA plasmidial clonado.	54
Figura 8 -	Eletroforese do produto de RTqPCR. Poços 1,2,3: 0,2pmol; Poço 4: NTC; Poços 5,6,7: 0,3pmol, Poço 8: NTC; Poços 9,10,11: 0,4pmol; Poço 12: NTC; Poços 13,14,15: 0,5pmol; Poço 16: NTC. Marcador molecular de 100 pares de bases (pb).	55
Figura 9 -	Curva de amplificação de diferentes concentrações da sonda <i>TaqMan</i> testadas com amostra de 10 pg da curva de diluição do DNA plasmidial clonado.	56
Figura 10 -	Eletroforese do produto de RT-qPCR para avaliação das concentrações dos primers. Poços 1, 2, 3: 0,15pmol/μl; Poço 4: NTC; Poços 5,6,7: 0,2pmol/μl; Poço 8: NTC; Poços 9,10,11: 0,25pmol/μl; Poço 12: NTC; Poços 13,14,15: 0,3pmol/μl; Poço 16: NTC (controle negativo sem o alvo). Marcador molecular de 100pb.	56
Figura 11 -	Curva padrão de amplificação acima do “threshold” mostrando em ordem decrescente a diluição do DNA plasmidial correspondendo a 100.000pg Ct= 19,63, 10.000pg Ct=22,95, 1000pg Ct= 25,31, 100pg Ct= 28,30 e 10pg Ct= 32,5.	57
Figura 12 -	Regressão linear a partir da curva padrão construída com concentrações conhecidas de DNA plasmidial variando entre 100.000pg a 10pg. Coeficiente de Correlação (R ² =0,98), eficiência de amplificação = 106% e slope=-3,18.	57
Figura 13 -	Conversão dos resultados de positivo para negativo da cultura e RT-qPCR durante o tratamento específico. Dia 0, a cultura apresentou 91,07% de positivos e a RT-qPCR 92,86%; no dia 15 a	62

cultura e RT-qPCR 23,2% e no dia 30, a cultura e RT-qPCR apresentaram 3,57% e 5,36% de positivos, respectivamente.

- Figura 14 -** Média da carga bacilar do alvo 85B nos 52 pacientes monitorados durante os dias 0, 15 e 30 de tratamento anti-TB. 63
- Figura 15 -** Quantificação da carga bacilar (log) de 3 pacientes acompanhados durante 30 dias de tratamento específico. 64

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos 98 pacientes selecionados para o estudo com suspeita de tuberculose pulmonar.	57
Tabela 2 - Resultados dos testes de baciloscopia, cultura e RT-qPCR no total de 98 pacientes com suspeita de TB pulmonar selecionados para a pesquisa.	58
Tabela 3 - Desempenho da Baciloscopia e RT-qPCR em 98 pacientes com suspeita de TB considerando a cultura, critérios clínicos epidemiológicos e/ou resposta terapêutica como padrão ouro.	58
Tabela 4 - Desempenho da cultura e RT-qPCR no monitoramento da resposta à terapia específica nos 56 pacientes com TB pulmonar antes (dia 0) e com 15 e 30 dias após início das drogas tuberculostáticas.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Anti-TB	antituberculose
AMTD	Amplified <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Direct Test
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BACTEC	Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
d.c	Depois de cristo
FDA-USA	Food and Drug Administration (Administração Federal de Alimentos e Medicamentos)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DAS	Strand Displacement Amplification (Amplificação por deslocamento da fita)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GERES	Gerência Regional de Saúde
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
kDa	Quilodalton
MDR	Multidrogarresistentes
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
NTC	<i>Non template control</i> (Controle negativo)
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real
RMR	Região Metropolitana do Recife
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossomal

RT-qPCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNases	Ribonucleases
RT	Transcrição reversa
R ²	Coefficiente de correlação
SES	Secretaria Estadual de Saúde
SINAN	Sistema de Informações de Agravos de Notificação
slope	Coefficiente angular
SR	Sintomáticos respiratórios
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multidrogarresistentes
TCT	Tomografia Computadorizada do Tórax
TS	Teste de Sensibilidade
Tm	<i>Melting temperature</i>
ZN	Ziehl-Nielsen

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Visão Histórica da Tuberculose	18
1.2	Epidemiologia da Tuberculose	19
1.2.1	Tuberculose no Mundo	19
1.2.2	Tuberculose no Brasil	20
1.2.3	Tuberculose em Pernambuco	21
1.3	O Agente Etiológico – <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
1.3.1	Classificação	22
1.4	Mecanismos de Transmissão e Fisiopatologia	23
1.5	Manifestações clínicas da TB	24
1.6	Tratamento	25
1.7	Métodos Convencionais para o diagnóstico da TB pulmonar	26
1.7.1	Baciloscopia	26
1.7.2	Cultura	28
1.8	Diagnóstico por Imagem	29
1.9	Métodos moleculares	29
1.9.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	29
1.9.2	PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR)	31
1.9.2.1	<i>PCR em Tempo Real no Diagnóstico da Tuberculose</i>	36
1.9.3	RT-qPCR (Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real)	37
2	JUSTIFICATIVA	40
3	OBJETIVOS	43
3.1	Geral	43
3.2	Específicos	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	Tipo de estudo	43
4.2	Local do estudo	43
4.3	Classificação dos pacientes	44
4.4	Considerações Éticas	44
4.5	Acompanhamento do Pacientes	45
4.5.1	Critérios de Exclusão	46

4.5.2	Critérios de Perda	46
4.6	Coleta e processamento dos espécimes biológicos	46
4.6.1	Pacientes da enfermaria e ambulatório	46
4.6.2	Descontaminação das amostras biológicas	46
4.7	Métodos de diagnóstico convencionais	47
4.7.1	Baciloscopia	47
4.7.2	Cultura e Identificação de micobactérias em meio Löwenstein-Jensen	47
4.8	Métodos moleculares	47
4.8.1	Alvo Molecular	47
4.8.2	Extração do RNAm do gene 85B do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	48
4.8.3	Reação de Transcrição Reversa	48
4.8.4	Subclonagem do alvo 85B para a construção da curva padrão	49
4.8.4.1	<i>Mini-prep de plasmídios recombinantes (Kit illustra)</i>	50
4.8.5	Construção da Curva padrão para a Quantificação Absoluta	50
4.8.6	Otimização da RT-qPCR	51
4.8.4.1	<i>Diluição da concentração dos primers e sonda</i>	51
4.8.4.2	<i>Condições da RT-qPCR</i>	52
4.9	Análise Estatística	53
5	RESULTADOS	54
5.1	Otimização da técnica de RT-qPCR	54
5.1.1	Avaliação da concentração de oligonucleotídeos e sonda	54
5.2	Curva-padrão a partir da subclonagem do alvo molecular 85B	56
5.3	Caracterização da população do estudo	58
5.4	Avaliação do desempenho para a detecção do <i>M. tuberculosis</i> através da baciloscopia, cultura e RT-qPCR no total de pacientes com suspeita de TB pulmonar	59
5.5	Avaliações dos métodos de cultura e RT-qPCR como marcadores de viabilidade bacilar e no monitoramento da resposta à terapêutica específica nos 56 pacientes com tuberculose pulmonar	60
5.6	Quantificação do alvo 85B na RT-qPCR	62
6	DISCUSSÃO	65
6.1	Avaliação do desempenho para a detecção do <i>M. tuberculosis</i> através da baciloscopia, cultura e RT-qPCR no total de pacientes com suspeita de TB pulmonar	67
6.2	Avaliações dos métodos de cultura e RT-qPCR como marcadores de viabilidade bacilar e no monitoramento da resposta à terapêutica	68

específica nos 56 pacientes com tuberculose pulmonar

6.3	Quantificação do alvo 85B na RT-qPCR	69
7	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72
	Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	86
	Apêndice B - Protocolo de pesquisa de Tuberculose	88
	Apêndice C - Quantificação do alvo 85B na RT-qPCR em relação ao número de cópias por reação (μ l) e por log baseado na curva padrão externa	90
	Anexo - Parecer do CEP/FIOCRUZ	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Visão histórica da tuberculose

A tuberculose (TB) é uma das doenças transmissíveis mais antigas do mundo, havendo relatos de evidências dessa patologia em esqueletos humanos datados de 8.000 a 5.000 a.C. na França, Itália, Alemanha, Dinamarca e Jordânia, e em múmias egípcias de 3.500 a 4.000 a.C. com deformidades sugestivas de tuberculose vertebral (COBERLY; CHAISSON, 2001).

Povos orientais, como os Hindus e Chineses, já descreviam quadros clínicos semelhantes à TB desde 2.000 a.C. Hipócrates, o pai da medicina, descreveu em 380 a.C. a doença como “tísica”, que significa “derreter-se”, devido às lesões caseosas que ela provocava. Aristóteles descreveu o caráter contagioso da tuberculose, por volta de 350 a.C. No século II d.C., um médico grego chamado Galeno desenvolveu esquemas terapêuticos para a doença que serviram por quase mil anos e incluíam repouso, boa alimentação e habitação em climas amenos (CONDE et al., 2002).

Apenas em 1478, na época Renascentista, é que houve o aprofundamento do estudo da histopatologia da TB. Andréas Versalius, em 1543, publicou a primeira obra de anatomia humana, baseada em dissecações reais, onde foi observado que indivíduos falecidos por tísica apresentavam, na maioria das vezes, lesões em suas cavidades pulmonares características de TB. Duzentos anos depois, o anatomista holandês Francisco de Layden, descreveu nódulos endurecidos encontrados em pulmões de indivíduos doentes e os denominou de “tubérculos”, chegando a conclusão de que a doença tinha início no pulmão. No início do século XVIII, durante a Revolução Industrial, a tuberculose torna-se uma epidemia, graças ao surgimento de cidades populosas e desorganizadas, trabalho extenuante do proletariado em fábricas com péssimas condições de trabalho e falta de higiene, propagando-se dessa forma pela Europa e posteriormente nas Américas e na África (KRITISKI et al., 2000).

Em 1882, Robert Koch finalmente isola o agente causal, o *Mycobacterium tuberculosis*, conhecido dessa forma como bacilo de Koch, recebendo mais tarde o Prêmio Nobel de Medicina. A descoberta de Koch permitiu que outros pesquisadores concentrassem esforços no desenvolvimento de novas terapias mais eficazes para o tratamento de pacientes tuberculosos (DUCATI et al., 2006).

Em 1916, os jovens cientistas Albert Calmette e Camille Guérin conseguiram isolar uma linhagem avirulenta do *M. bovis* e a partir de sucessivas repicagens em meio de cultura,

desenvolveram a vacina intradérmica, atualmente conhecida como BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), amplamente utilizada para combater a tuberculose de maneira profilática em crianças (DUCATI et al., 2006).

No Brasil, a TB surgiu por volta da época do descobrimento, trazida pelos colonizadores jesuítas e escravos africanos. Os índios que adquiriam a TB, por não terem imunidade contra a doença, morriam rapidamente e dessa forma muitas tribos indígenas foram dizimadas em curto espaço de tempo (RIBEIRO, 1971).

Até a década de 1940, o tratamento da TB ainda era basicamente repouso e boa alimentação nos sanatórios. Somente nos anos 60 é que se desenvolveu um esquema eficaz denominado esquema tríplice, onde três antibióticos são utilizados simultaneamente. Esse esquema foi instituído no Brasil pelo professor Hélio Fraga e utilizava primeiramente as drogas estreptomicina, isoniazida e ácido aminossalicílico e tinha duração de 18 a 24 meses, e foi posteriormente modificado na década de 80, quando se passou a utilizar as drogas rifampicina, isoniazida e pirazinamida e o tratamento foi encurtado para 6 meses (CONDE et al., 2002).

O conhecimento levou as nações desenvolvidas a acreditar que no fim do século XX a TB estaria, senão erradicada, pelo menos confinada aos países pobres. Entretanto, os intensos movimentos migratórios populacionais, a falta de sistemas públicos de saúde eficazes, as crises econômicas, o crescimento da população marginalizada rural e urbana e a expansão da epidemia da AIDS foi tornando a doença cada vez mais difícil de ser controlada, assumindo proporções endêmicas (CONDE et al., 2002).

1. 2 Epidemiologia da Tuberculose

1.2.1 Tuberculose no Mundo

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2009), um terço da população mundial encontra-se infectada pelo *M. tuberculosis*, resultando em 8 a 10 milhões de novos casos por ano. Cerca de 10% dos indivíduos infectados (nove milhões) desenvolvem a TB ativa, 5.000 morrem diariamente e 3 milhões anualmente, atingindo principalmente os jovens e adultos produtivos.

De acordo com dados estatísticos, a incidência global da doença continua a crescer. Este aumento tem sido atribuído a diversos fatores, como o aumento da multirresistência aos medicamentos anti-tuberculínicos, o aumento do uso de drogas injetáveis, a pandemia do

HIV/AIDS no início dos anos 80, a elevada taxa de abandono ao tratamento, a desigualdade social, o aumento de imigrantes de áreas de alta prevalência para nações desenvolvidas, o envelhecimento da população mundial, a transmissão ativa nos ambientes de aglomeração humana (como prisões, asilos, hospitais e abrigos para mendigos) e a degradação dos sistemas de saúde pública (BLOOM; MURRAY, 1992; FÄTKENHEUER et al., 1999). Dentre todos os fatores citados, a desigualdade social deve ser enfatizada como o aspecto de maior importância nos países em desenvolvimento uma vez que tem sido a responsável pela geração de pobreza da má nutrição, subcondições de moradia e educação, que inevitavelmente terminam por influenciar praticamente todos os outros fatores associados ao desenvolvimento da tuberculose (DUCATI et al., 2006).

Aproximadamente, 95% dos casos de TB ocorrem nos países em desenvolvimento, países esses que detêm 98% dos casos de mortes mundiais pela doença (KHAN et al., 2006; OMS, 2009). Tais dados referem-se principalmente a países da África, sudeste asiático e algumas regiões do Pacífico, onde a TB tem se transformado em ameaça tanto para a saúde pública quanto para a economia. A doença parece, em certo ponto, estar sob controle em países desenvolvidos como o Japão e os Estados Unidos (DUCATI et al., 2006). Mesmo assim, é consenso internacional que haja uma intervenção a nível global para o controle da tuberculose (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

1.2.2 Tuberculose no Brasil

No Brasil, a TB é uma das principais causas de morbimortalidade, ocupando o 19º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos no mundo, com o registro de 89.626 casos em 2009, sendo 74.470 da forma pulmonar (BRASIL, 2010; RUFFINONETTO, 2002; WHO, 2010). Em 2009, foram notificados 10.286 casos de retratamento, sendo 50,6% desses devido às recidivas e 49,4% devido aos casos de reingresso após abandono. Ao analisar os casos, nota-se que a região Sul (13,7%) apresenta a maior relação percentual, seguida pelas regiões Sudeste (13,4%), Nordeste (12,4%) e Norte (8,7%) (BRASIL, 2009). As maiores incidências estão nos estados do Rio de Janeiro (69,8 por 100 mil habitantes), Amazonas (65,8), Pernambuco (47,6), Pará (46), Ceará (40,9) e Rio Grande do Sul (44,8). As menores taxas de incidência do país foram registradas no Distrito Federal (11,2), Tocantins (13,2) e Goiás (14,6) (BRASIL, 2011).

Em relação à influência dos fatores responsáveis pelo crescimento dos casos de TB no mundo, o Brasil apresenta uma condição intermediária quando comparado a outros países, e

ainda mantém uma prevalência pequena em relação ao problema da multirresistência às drogas, mas lida com grande desigualdade social, apresentando grupos populacionais mais vulneráveis à tuberculose como índios, presidiários e moradores de rua (DUCATI et al., 2006; BRASIL, 2009).

1.2.3 Tuberculose em Pernambuco

Em Pernambuco, foram confirmados 505 casos de tuberculose até o final de março, em 2011. Em média, ocorrem 4.230 casos novos da doença ao ano. O estado detém o 4º lugar nacional em taxa de incidência da doença, 2º lugar geral em mortalidade e 1º lugar em número de casos no Nordeste, sendo Recife a capital brasileira com maior taxa de incidência (48,2%). Além disso, o Estado tem o maior percentual de abandono do tratamento (11%). Os municípios que fazem parte da I Gerência Regional de Saúde (GERES) abrigam toda a Região Metropolitana do Recife (RMR), num total de 18 municípios mais a ilha de Fernando de Noronha (Abreu e Lima, Araçoiaba, Cabo de Santo Agostinho, Camaragibe, Chã Grande, Fernando de Noronha, Goiana, Igarassu, Ipojuca, Itamaracá, Itapissuma, Jaboatão dos Guararapes, Moreno, Olinda, Paulista, Pombos, Recife (Sede), São Lourenço da Mata, Vitória de Santo Antão), detém 70% dos casos dentre as 11 GERES do estado. No ano de 2010 observou-se que cerca de 85,4% dos casos de tuberculose no estado apresentaram a forma pulmonar e 3,2% a forma extrapulmonar (TUBERCULOSE, 2011).

Buscando romper a cadeia de transmissão e reverter a situação da tuberculose no país, o Ministério da Saúde preconiza índices de cura acima de 85% e de abandono igual ou abaixo de 5% dos casos. Em 2009, Pernambuco alcançou apenas 70% de cura e registrou 11% de abandono no tratamento o que contribuiu para a manutenção da situação atual (TUBERCULOSE, 2011). Para combater a doença, a Secretaria Estadual de Saúde (SES), criou o Projeto Sanar – Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas da Secretaria Estadual de Saúde (SES), em parceria com os municípios, FIOCRUZ - Pernambuco, Secretaria Estadual de Educação, Ministério da Saúde (MS), Organização Pan-Americana de Saúde (Opas), Organização Mundial de Saúde (OMS), entre outras instituições, no qual pretende até 2014, reduzir ou eliminar as doenças transmissíveis negligenciadas que apresentam indicadores inaceitáveis. São, ao todo, sete doenças negligenciadas (Tuberculose, Esquistossomose, Hanseníase, Filariose, Doença de Chagas e Tracoma) enfermidades tropicais endêmicas que atingem a população de baixa renda das cidades pernambucanas. O projeto SANAR foi lançado no primeiro semestre de 2011 e pretende implantar atividades de controle da TB em 108 municípios prioritários. Pernambuco é o primeiro

estado brasileiro a desenvolver um programa específico para enfrentamento dessas doenças (MENEZES, 2011).

Serão investidos R\$ 5,6 milhões para vigilância epidemiológica, fortalecimento e capacitação das equipes de atenção básica objetivando a identificação e manejo clínico adequado das doenças negligenciadas, a ampliação do diagnóstico e a melhora do acesso a tratamentos e medicamentos específicos (MENEZES, 2011).

1.3 O Agente Etiológico – *Mycobacterium tuberculosis*

1.3.1 Classificação

São reconhecidas atualmente mais de 120 diferentes espécies de micobactérias (TORTOLI, 2006). Estas espécies estão incluídas no gênero *Mycobacterium*, sendo próximo dos Actinomicetos. Esse gênero pertence à família *Mycobacteriaceae* que juntamente com as famílias *Actinomycetaceae*, *Nocardiaceae*, *Streptomycetaceae* e outras famílias bacterianas compõem a ordem Actinomycetales (FROTHINGHAM, 1995).

O gênero *Mycobacterium* contém um grande número de espécies, muitas delas saprófitas do solo, e a minoria das espécies são patogênicas ao homem, causando tuberculose (*M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*) e lepra (*Mycobacterium leprae*). Apresenta esta denominação porque pelo fato de ocasionalmente se observam nas culturas o crescimento das colônias em forma de filamentos semelhante aos fungos. Entretanto, normalmente são vistos ao microscópio como um bacilo típico, sob a forma de bastões (TORTORA et al., 2005).

O *M. tuberculosis* é uma forma de transição entre as eubactérias e os actinomicetos. Mede de 1 a 4 µm de comprimento por 0,3 a 0,6 µm de largura, além de apresentar um complexo envelope celular. Trata-se de um bacilo imóvel que não forma esporos, não produz toxinas, aeróbio estrito e cujo único reservatório é o ser humano. É um microorganismo considerado parasita intracelular facultativo, sendo capaz de sobreviver no interior de células fagocitárias, estabelecendo sua infecção, preferencialmente, nos pulmões, onde normalmente condiciona-se a um estado de latência, enquanto o sistema imunológico do hospedeiro prevalece e mantém a infecção sob controle (KRITSKI et al., 2000).

É considerada uma micobactéria álcool-ácido resistente, de crescimento lento, com tempo de geração de 18 a 48 horas, tanto em meio artificial quanto em organismos animais, dependendo da oferta de oxigênio, de nutrientes e do pH do meio, sendo necessárias várias semanas para que as colônias tornem-se visíveis no meio de cultura (KRITSKI et al., 2000;

DUCATI et al., 2006). Muitas das características dessas micobactérias, como sua coloração, resistência ao álcool-ácido, a resistência a drogas, sua patogenicidade e a taxa de crescimento lento, estão relacionadas à estrutura lipídica, distinta, de sua parede celular. A parede é formada, em sua porção externa, por ácido micólico, que forma uma camada cérea resistente à água. As micobactérias conseguem resistir a situações adversas como o ressecamento e algumas drogas antimicrobianas não conseguem penetrar devido à peculiaridade de sua parede celular (TORTORA et al., 2005). O crescimento lento desse gênero de bactérias deve-se à dificuldade com que os nutrientes têm de atravessar sua parede celular. Normalmente levam-se semanas para que se consiga visualizar uma colônia crescida em meio de cultura específico para as micobactérias (TORTORA et al., 2005).

1.4 Mecanismos de Transmissão e Fisiopatologia

A transmissão ocorre por meio de gotículas contendo os bacilos expelidos por um doente com tuberculose pulmonar ao tossir, espirrar ou falar. Quando essas gotículas são inaladas por pessoas saudáveis, podem provocar a infecção tuberculosa (BRASIL, 2008).

As formas mais frequentes de contágio são a fala, o espirro e, principalmente, a tosse (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000). As partículas contagiantes (núcleos de Wells), com bacilos em suspensão no ar, alcançam os alvéolos e apresentam um tamanho de 5 a 10 μm . Tais partículas, com um ou dois bacilos viáveis, podem permanecer suspensas no ar por várias horas. Chegando aos alvéolos, são fagocitadas pelos macrófagos alveolares e então iniciam a multiplicação. Apenas 1% dos bacilos sobrevive por algumas horas nas gotículas suspensas, desde que não estejam expostos à ventilação e à luz solar (KRITSKI, 2000).

As características dos (focos de contágio) pacientes com TB pulmonar e escarro positivo na baciloscopia: bacilíferos, dos contatos intra-domiciliares ou institucionais, bem como o ambiente, a maneira como ocorrem suas relações e o tempo de exposição, interferem na transmissão da TB. Portanto, é consenso que a transmissão do Mtb é determinada por alguns fatores: 1) o número de organismos expelidos no ar; 2) a concentração de organismos no ar determinado pelo volume do espaço físico do ambiente e a ventilação promovida pelo foco de contágio; 3) o tempo de exposição em que a pessoa respira o ar contaminado e 4) a suscetibilidade genética ou predisposição dos contatos exposto (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000; BRASIL, 2008). Calcula-se que, numa determinada população, uma pessoa bacilífera infecte de 10 a 15 pessoas por ano, com as quais tem contato. O risco de contágio de contatos intra-domiciliares ou institucionais é de 5% a 20%, e de contatos casuais de 0,2%

a 2% (KRITSKI, 2000). Até pouco tempo a principal ferramenta no diagnóstico e monitoramento do tratamento do paciente com TB pulmonar era a baciloscopia positiva. Entretanto, com o uso de tipagem molecular tem sido possível demonstrar que mesmo os pacientes com baciloscopia negativa e cultura positiva são responsáveis por 17 a 20% da transmissão da TB em determinada região, principalmente em grandes centros urbanos com elevada taxa de tuberculose associada a outras co-morbidades, como a infecção pelo HIV (BEHR et al., 1999). Tais dados têm sinalizado os pesquisadores e gestores de políticas públicas de que se torna necessário identificar outras técnicas de diagnóstico rápido de TB, mais sensíveis que a baciloscopia e no mínimo similares à cultura de micobactérias para ser utilizada como uma nova ferramenta do controle de TB, nestas regiões.

1.5 Manifestações Clínicas da TB

A TB é uma doença crônica ou subaguda, podendo apresentar períodos de remissão, retardando o paciente na busca de serviço médico especializado. Esta conduta pode agravar ainda mais seu estado clínico e pode aumentar o tempo de transmissão do bacilo na população. As manifestações clínicas da TB variam muito e dependem de diversos fatores, inerentes ao microrganismo e ao hospedeiro (imunodeficiência, desnutrição, entre outras), bem como as suas interações, as quais influenciam diretamente na apresentação clínica da doença (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000).

Como a TB é normalmente adquirida por inalação do bacilo, a localização inicial é no pulmão. Passa a haver, então, no local da inoculação inicial, um foco pequeno, arredondado, de 1 a 2 mm, esbranquiçado, de consistência amolecida e constituído, principalmente, por material caseoso. Esse foco é circundado por afluxo celular de linfócitos, células epitelióides (macrófagos ativados e modificados) e macrófagos (foco primário), localizado principalmente no terço médio, compreendendo a parte inferior do lobo superior, lobo médio e, particularmente, o ápice do lobo inferior. Normalmente, esse nódulo é único e com as dimensões mencionadas, mas há relatos da existência de múltiplos focos primários e de focos de maiores dimensões. A associação do foco primário aos gânglios satélites da sua região dá-se o nome de **complexo primário de Ranke**. O foco pulmonar, que pode ser visto nas radiografias, chama-se **nódulo de Gohn**. Cerca de 90% da população infectada consegue bloquear o avanço do processo, a partir da formação do complexo primário de Ranke, permanecendo apenas como infectados (BRASIL, 2010)

Nos pacientes adultos, maiores de 15 anos, a tuberculose atinge os pulmões em cerca de 90% dos casos. Nos menores de 15 anos, este percentual é de 75%, podendo, entretanto, se localizar em outras partes do organismo, ocorrendo uma disseminação para outros órgãos, causando o que é chamado de tuberculose extrapulmonar (pleural, óssea, meningoencefálica, renal, genitourinária, entre outras). Dentre as formas extrapulmonares isoladas, a mais freqüente é a forma ganglionar (BRASIL, 2009). Nos pacientes com TB pulmonar e infectado pelo HIV, principalmente naqueles na fase avançada de sua imunodepressão, é menos comum a tosse produtiva e hemoptise e mais freqüente a dispnéia. Estas características clínicas dificultam o diagnóstico clínico e a obtenção de amostras clínicas para exame baciloscópico (KRITSKI, 2000).

1.6 Tratamento

A tuberculose embora seja uma doença grave, apresenta cura em praticamente 100% dos casos novos, sensíveis aos medicamentos anti-TB (anti-tuberculose), desde que, uma vez diagnosticada a doença, sejam obedecidos os princípios básicos da terapia medicamentosa e a adequada operacionalização do tratamento (BRASIL, 2010). Contudo, o tempo longo de tratamento e os efeitos secundários indesejáveis, levam o paciente ao abandono, possibilitando o surgimento de cepas resistentes aos tuberculostáticos. O não cumprimento do tratamento tem levado a OMS a investir em uma estratégia global, através de um processo conhecido atualmente como “sistema de tratamento diretamente observado” de curso breve (DOTS), em que profissionais de saúde aconselham os doentes, realizam vigilância progressiva e certificam-se de que cada medicamento seja tomado na dose correta (DUCATI *et al.*, 2006).

Os antimicrobianos recomendados pela OMS e mais comumente usados para o tratamento da TB em países em desenvolvimento nas Américas são: a estreptomicina, etambutol, etionamida, e pirazinamida, além da Isoniazida e Rifampicina (SCHERER, 2007)

Em 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, juntamente com o seu Comitê Técnico Assessor reviu o sistema de tratamento da TB no Brasil. Baseado nos resultados preliminares do II Inquérito Nacional de Resistência aos medicamentos antiTB, que mostrou aumento da resistência primária à isoniazida (de 4,4 para 6,0%), e a resistência primária à isoniazida associada à rifampicina (de 1,1 para 1,4%) foi introduzido o Etambutol como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do esquema básico (BRASIL, 2010, BARRETO *et al.*, 2011). Espera-se com a introdução de um quarto

fármaco aumentar o sucesso terapêutico e evitar o aumento da multirresistência (considerada a resistência a Rifampicina + Isoniazida) (MUDANÇAS..., 2010).

A apresentação farmacológica deste esquema passa a ser em comprimidos com dose fixa combinada dos 4 fármacos (Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Pirazinamida) em 1 comprimido (4 em 1) para a fase intensiva do tratamento. E para a fase de manutenção 2 fármacos (Rifampicina e Isoniazida) em 1 comprimido (MUDANÇAS..., 2010).

Os comprimidos são formulados com doses reduzidas de Isoniazida e Pirazinamida em relação às atualmente utilizadas no Brasil. Nesse primeiro momento, as mudanças ocorrerão apenas no tratamento dos doentes de tuberculose com mais de dez anos de idade (MUDANÇAS..., 2010).

As vantagens da mudança da apresentação dos fármacos são, entre outras, o maior conforto do paciente, pela redução do número de comprimidos a serem ingeridos; a impossibilidade de tomada isolada de fármacos, o cumprimento da prescrição médica, e a simplificação da gestão farmacêutica em todos os níveis (MUDANÇAS..., 2010).

A realização do tratamento completo é essencial para o controle da tuberculose e é cuidadosamente monitorado e registrado nas bases de dados do SINAN: 63% dos pacientes foram considerados curados com o tratamento completo, mas 11% dos pacientes abandonaram o tratamento antes do fim. Essas estimativas, embora demonstrem melhora, não atingem as metas do Ministério da Saúde de, respectivamente, 85% e 5% e estão aquém do necessário para interrupção da transmissão (BARRETO, 2011).

1.7 Métodos convencionais para o diagnóstico da TB pulmonar

1.7.1 Baciloscopia

A pesquisa microscópica de Bacilos Álcool-Ácido Resistente (BAAR) em amostras clínicas de escarro, a qual é denominada rotineiramente de baciloscopia, é o método prioritário para o diagnóstico e acompanhamento dos casos de tuberculose pulmonar (VIEIRA et al., 2008). A baciloscopia consiste na visualização microscópica do bacilo após fixação em lâmina e coloração específica do material a ser analisado.

O método de coloração específico para micobactéria usado na rotina do diagnóstico é o Ziehl-Nielsen (ZN). Este método baseia-se na capacidade das micobactérias em reter a fucsina após coloração quando se apresentam como bastonetes, ligeiramente delgados, corados em vermelho com fundo azul, que não descora com álcool-ácido, sendo por isso

referida como BAAR. A sua utilização é recomendada pelo Ministério da Saúde para todos os laboratórios que realizam o diagnóstico da TB pulmonar, uma vez que possibilita a identificação de BAAR e utiliza o microscópio óptico comum, para leitura do esfregaço (BRASIL, 2008).

A metodologia é simples, rápida, de fácil execução e de baixo custo. A baciloscopia disponibiliza uma ampla cobertura diagnóstica, possibilitando a identificação da principal fonte de infecção (pacientes bacilíferos, ou seja, com baciloscopia positiva), o que permite a pronta atuação na interrupção da cadeia de transmissão (GANGULY, 2002; PERKINS, 2000). No entanto, a técnica apresenta sensibilidade limitada por necessitar de 5.000 a 10.000 bacilos por ml da amostra de escarro para obter-se um resultado positivo, o que implica grande possibilidade de resultados falso-negativos, ou seja, um esfregaço negativo não exclui um caso de TB (CASTELO FILHO et al. 2004; LIMA et al., 2008). Esse fato é ainda mais notável quando a infecção ocorre em outras regiões (ósseos, rins, gânglios, pleura, meninges, entre outros), onde um número ainda menor de organismos pode causar manifestações clínicas (KRITSKI, 2000).

Em pacientes com tuberculose pulmonar (confirmada através da cultura) a sensibilidade da baciloscopia varia de 50% a 80%. Nos indivíduos paucibacilares a maioria das baciloscopias é negativa. Na TB infantil e co-infectados pelo HIV a sensibilidade oscila entre 30 a 50% e nos pacientes com a forma extrapulmonar entre 35% a 70% (COMISSÃO DE TUBERCULOSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2009).

Estas limitações tornam-se críticas principalmente pelo aumento da doença sem confirmação bacteriológica (baciloscopia negativa) e em regiões onde a infecção pelo HIV é mais prevalente. Além do mais, não é específica, uma vez que não é possível distinguir entre as espécies de micobactérias descritas, necessitando identificação da micobactéria posteriormente (KRISTIKS, 2000). Metodologias alternativas à baciloscopia devem ser estudadas e desenvolvidas para aumentar a detecção de casos e controle da transmissão da doença (GANGULY, 2002; PERKINS, 2000).

1.7.2 Cultura

O isolamento do *M. tuberculosis* através da cultura é a metodologia que permite a confirmação diagnóstica da TB, sendo considerado, como o padrão-ouro (ARNOLD, 2007). O meio de cultura mais utilizado é o Lowenstein-Jensen, o qual é complexo, rico e propicia o crescimento da maioria das micobactérias. A cultura identifica o bacilo em mais de 81% dos casos de TB e apresenta uma especificidade acima de 98,5% em uma sensibilidade maior que a da baciloscopia, e requer cerca de 10-100 organismos por ml da amostra (API TB CONSENSUS EXPERT COMMITTEE, 2006). Entretanto, a cultura requer cerca de 3 a 8 semanas para obtenção do resultado, levando ao retardo do diagnóstico e início do tratamento específico. No Brasil, cerca de 26% dos pacientes são tratados sem confirmação bacteriológica de tuberculose pulmonar, com base na associação de critérios clínicos, epidemiológicos, radiológicos e resposta ao tratamento específico (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000; NOUSSAIR et al., 2009; SCHERER et al., 2009).

A negatização da cultura ocorre cerca de 1 a 2 meses de iniciado o tratamento e está relacionada com a morte do *M. tuberculosis* devida a eficácia das drogas, sendo considerada o melhor preditor de sucesso do tratamento (DESJARDIN et al., 2010; MDIVANI, 2009). Regimes terapêuticos eficazes resultam em um decréscimo rápido no número de Mtb viáveis no escarro, com uma diminuição na multiplicação do bacilo cultivado em cerca de 10 vezes mais acentuada entre a primeira e segunda semana após o tratamento específico. Essas dificuldades prejudicam o controle da doença, uma vez que o diagnóstico precoce é fundamental para interromper o ciclo de transmissão (BOLLELA et al., 1999; CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009; CHENG et al., 2005)

Devido a crescente e rápida disseminação da tuberculose, novas tecnologias para detecção precoce vêm sendo desenvolvidas com objetivo de reduzir o tempo de diagnóstico da doença. Com o intuito de se obter uma resposta mais rápida, novas técnicas de cultivo foram introduzidas na prática laboratorial nos últimos anos, tais como o sistema BACTEC (BECTON DICKINSON DIAGNOSTIC INSTRUMENTS SYSTEMS). É um sistema comercial semi-automatizado, de cultivo em meio líquido, usado para o isolamento e a identificação de micobactérias e realização dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos em uso na rotina de diversos laboratórios de referência. Fundamenta-se na detecção radiométrica de CO₂ produzido pela atividade metabólica das micobactérias, a partir de meio de cultura específico, marcado com C₁₄. Esse teste pode ser realizado em qualquer material biológico, incluindo sangue, escarro, urina, lavado bronco-alveolar, líquido de serosas,

tecidos, entre outros (OPLUSTIL et al., 2002). Os sistemas BACTEC 460TB e o BACTEC-MGIT 960 são os, atualmente, recomendados. Assim, a principal vantagem do BACTEC é ser mais rápido que a cultura convencional, levando, em média, 15 a 21 dias para fornecer o resultado, cerca da metade do tempo em relação ao método de cultura (NEVES et al., 2007).

1.8 Diagnóstico por imagem

A radiografia do tórax constitui, em muitas ocasiões, a primeira abordagem diagnóstica em Pneumologia, não apenas por seu baixo custo e facilidade de realização, mas, sobretudo, pelas inúmeras informações que proporciona quando criteriosamente avaliada. É o método diagnóstico de grande importância na investigação da tuberculose, sobretudo, da forma pulmonar. Diferentes achados radiológicos apontam para suspeita de doença em atividade ou doença no passado, além do tipo e extensão do comprometimento pulmonar. Deve ser solicitada para todo o paciente com suspeita clínica de TB pulmonar, sendo indispensável submetê-los a exame bacteriológico.

No entanto, cerca de 15% dos casos de TB pulmonar não apresentam alterações radiológicas, principalmente pacientes imunodeprimidos (COMISSÃO DE TUBERCULOSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2009).

1.9 Métodos moleculares

1.9.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Métodos moleculares de amplificação do DNA propostos para o diagnóstico da tuberculose demonstraram ser uma abordagem mais efetiva em relação aos métodos tradicionais, possibilitando o diagnóstico precoce do paciente e o estabelecimento do tratamento específico (ALMEDA et al., 2000; BROCCOLO et al., 2003; GREEN et al., 2009).

A necessidade de um teste rápido de alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico laboratorial da tuberculose levou ao desenvolvimento de métodos moleculares para a detecção e identificação do *Mycobacterium tuberculosis* diretamente de espécimes clínicos, ou a partir de colônias isoladas em cultivo (MELLO, 2005).

A PCR é um método considerado sensível e específico que vem sendo utilizado na detecção de DNA ou RNA de micobactérias, diretamente de amostras clínicas como escarro,

lavado brônquico, líquido cefalorraquidiano, líquido ascítico, material de biópsia, entre outros (MELLO et al., 2005; POROCA, et al., 2009; LIMA et al., 2009).

O princípio básico da técnica de PCR consiste na amplificação de uma região selecionada do DNA de fita simples ou dupla, ou de RNA. A amostra a ser amplificada, ou seja, a sequência alvo de um determinado gene ou parte dele a ser amplificada constitui uma sequência de bases previamente conhecida. O conhecimento dessa sequência permite a síntese de oligonucleotídeos, denominados *primers* ou iniciadores da PCR que irá reproduzir a replicação do DNA *in vitro*, porém a partir de um pequeno fragmento específico. A reação consiste de três etapas: a primeira, chamada de desnaturação, refere-se à separação da fita dupla de DNA em fita simples, através do aquecimento; a segunda, chamada de anelamento, consiste no pareamento das sequências dos iniciadores às sequências complementares no DNA alvo e a terceira etapa é denominada de fase de extensão, e desenvolve-se através da polimerização da nova fita de DNA com o auxílio da enzima Taq polimerase. Todo esse processo se dá em um termociclador, que gera automaticamente as modificações de temperatura necessárias a cada fase da reação. A partir de cada iniciador, uma cópia de DNA é sintetizada, e o produto ao final das três etapas é utilizado como substrato para as novas reações de amplificação, que se desenvolvem em série. Portanto, ocorre uma reação em cadeia de forma exponencial, permitindo a obtenção de novos produtos do DNA específico (MELLO et al., 2005). Assim, o fragmento alvo é amplificado, gerando múltiplas cópias, capazes de serem detectadas. Entre as técnicas para a sua detecção, a mais utilizada é a eletroforese em gel de agarose. Outras técnicas também podem ser usadas para a detecção do material amplificado, e algumas apresentam uma sensibilidade de detecção superior àquela da eletroforese. É o que ocorre quando associamos a PCR às técnicas de hibridação para detecção dos produtos amplificados (DROBNIEWSKI et al., 2003).

A sensibilidade da técnica de PCR está relacionada, principalmente, ao número de cópias da sequência alvo presente no genoma do patógeno, tipo da amostra, forma de TB, escolha dos iniciadores, bem como inibidores presentes na amostra clínica (POROCA et al., 2009).

Dependendo do “padrão ouro” considerado, estudos mostram que a sensibilidade do PCR varia entre 77% e 95% e a especificidade é maior que 95% em amostras com baciloscopia positiva (KIVIHYA-NDUGGA et al., 2004; FLORES et al., 2005).

Através de um estudo de meta-análise realizado por Sarmiento e colaboradores em 2003, sobre o papel da técnica de PCR para o diagnóstico da TB pulmonar com escarro negativo à baciloscopia, os autores concluíram que a técnica não possui acurácia consistente o

suficiente para ser indicada de forma rotineira para o diagnóstico de TB pulmonar paucibacilar devendo ser usada com um padrão de referência que combina cultura e critérios clínicos e epidemiológicos do paciente (SARMIENTO et al., 2003).

1.9.2 PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR)

A qPCR foi inicialmente introduzida em 1992 por Higuchi e colaboradores e representa um significativo avanço biotecnológico para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias (ESPY et al., 2006; GOMES et al., 2006; MDIVANI et al., 2010; PAIVA CAVALCANTI et al., 2008).

A qPCR é uma técnica que está se tornando amplamente utilizada em laboratórios de biologia molecular. A possibilidade de monitorar a reação de amplificação em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. A PCR em tempo real realiza a quantificação de ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado *Cycle Threshold* (C_T). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseada na fluorescência (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004).

Diferente da PCR tradicional, a reação exponencial é monitorada ao mesmo tempo em que ela ocorre, economizando tempo por reduzir a necessidade de análise subsequente (eletroforese em gel de agarose). O monitoramento em tempo real também fornece uma mais acurada representação da quantidade de material iniciado quando comparado com o PCR tradicional (BUSTIN, 2000). A capacidade de obter dados quantitativos faz esta tecnologia ser utilizada em aplicações variadas, incluindo identificação de alelos em DNA genômico, análise de sequências virais, bacterianas ou de protozoários a partir de várias fontes, análise de patógenos em alimentos, análise de produtos transgênicos, além da aplicação em diagnóstico (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004).

A qPCR requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência e na coleção da emissão e um computador com um software para aquisição de dados e análise final da reação (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004).

O sistema de detecção é baseado no uso de corantes ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento em tempo real do produto amplificado. As moléculas absorvem e

emitem luz em comprimento de onda específico. Os compostos fluorescentes mais utilizados são o SYBR Green I e TaqMan ou sondas de hidrólise (GOMES, 2008).

O SYBR Green (Figura 1) se liga a qualquer sequência de dupla fita de DNA gerada durante a amplificação. É baseada nessa propriedade que é feita a leitura da fluorescência na reação, de acordo com a diferença entre a fluorescência inicial e final. Sendo, dessa forma, o aumento da fluorescência proporcional à quantidade de ácido nucléico de fita dupla amplificado na reação (KUBISTA, 2005; GOMES, 2011).

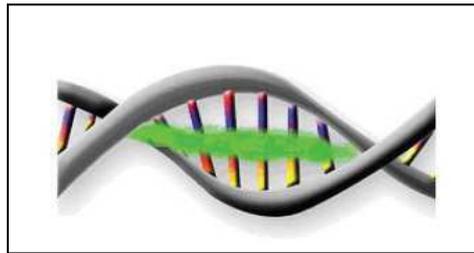


Figura 1. Ilustração de uma molécula de SYBR Green I entre a dupla fita de DNA.
Fonte: Novais, Pires-Alves e Silva (2004)

Em uma reação que utiliza SYBR Green I é fundamental a análise da curva de *melting*, ou curva de dissociação (Figura 2) a qual é gerada após o encerramento da sequência de ciclos de amplificação da qPCR. A inclusão da curva de dissociação é essencial para verificar se houve formação de um único produto ou se produtos inespecíficos também foram formados. O aparecimento de um único pico na curva de melting sugere a existência de um único produto, porém se for observado vários picos na curva, pode-se considerar a possibilidade de formação de produtos inespecíficos ou a eventual formação de dímeros de iniciadores (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010).

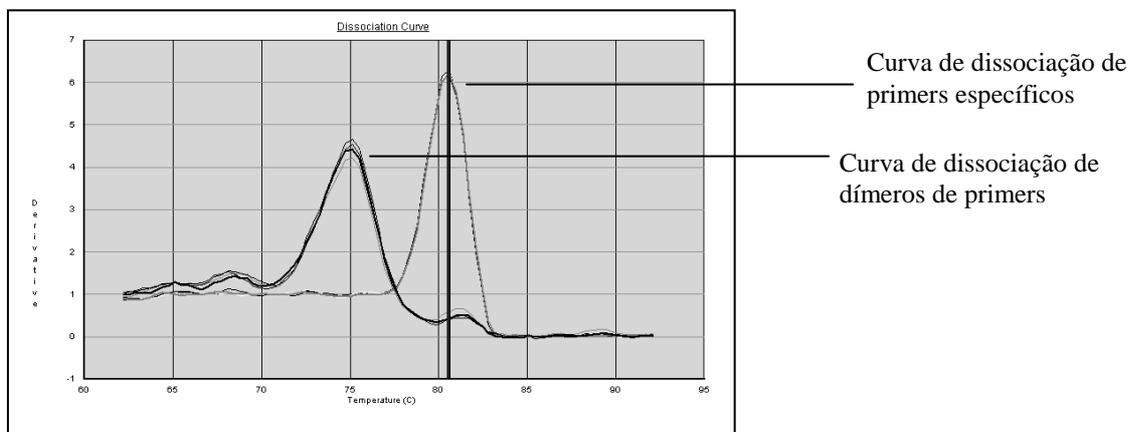


Figura 2. Curvas de dissociação de um ensaio com Syber Green mostrando uma curva de dissociação de primers específicos e de dímeros de primers.

Fonte: Applied Biosystems (2006)

Uma das grandes vantagens do uso de SYBR Green I como corante fluorescente para detecção dos produtos da amplificados é o custo (PARASHAR et al, 2006; FRAGA; MEULIA; FENSTER, 2008). Atualmente é o mais barato do mercado, de fácil utilização, além de ter mostrado sensibilidade e eficiência semelhantes às outras formas de detecção (GOMES, 2011). Como desvantagem do uso de SYBR Green I tem-se importante destacar a falta de especificidade do corante com a sequência alvo, uma vez que a molécula de SYBR Green I se liga a qualquer DNA dupla-fita, incluindo sequências inespecíficas e dímeros de *primers* (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010). Isso exige que o sistema (iniciadores e temperaturas de ciclagem) seja muito bem otimizado no intuito de minimizar a amplificação de sequências que não sejam as desejadas, e conseqüentemente formarem mais de um pico (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010).

Outra forma de gerar fluorescência é através do uso de uma sonda (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA), dirigida especificamente a uma região interna da sequência que se deseja amplificar, sendo um exemplo destas a TaqMan (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010).

Esta sonda (Figura 3) apresenta em uma extremidade 5' ligada a um fluoróforo e sua extremidade 3' a uma molécula *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz e calor) capaz de, por um fenômeno físico denominado FRET- *Transferência de Energia de Ressonância por Fluorescência*, absorver a fluorescência emitida pelo fluoróforo após este ser estimulado por luz de comprimento de onda específico. Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após atividade exonuclease 5' → 3' da Taq DNA polimerase (NOVAIS; PIRES-ALVES, SILVA, 2004).

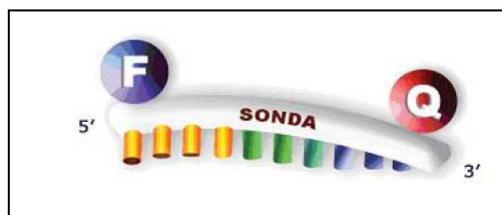


Figura 3. Sonda com tecnologia TaqMan mostrando numa extremidade um fluoróforo e na outra um quencher.

Fonte: Novais; Pires-Alves; Silva, 2004

Nota: **F** - Fluoróforo **Q** - Quencher

Durante a PCR em tempo real a sonda TaqMan hibridiza com a sequência de fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. No processo de amplificação a sonda TaqMan é degradada devido a atividade exonuclease 5' → 3' da Taq DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo

do *quencher* resulta em um aumento da intensidade da fluorescência (Figura 4). Assim durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da seqüência alvo é estabelecida (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004).

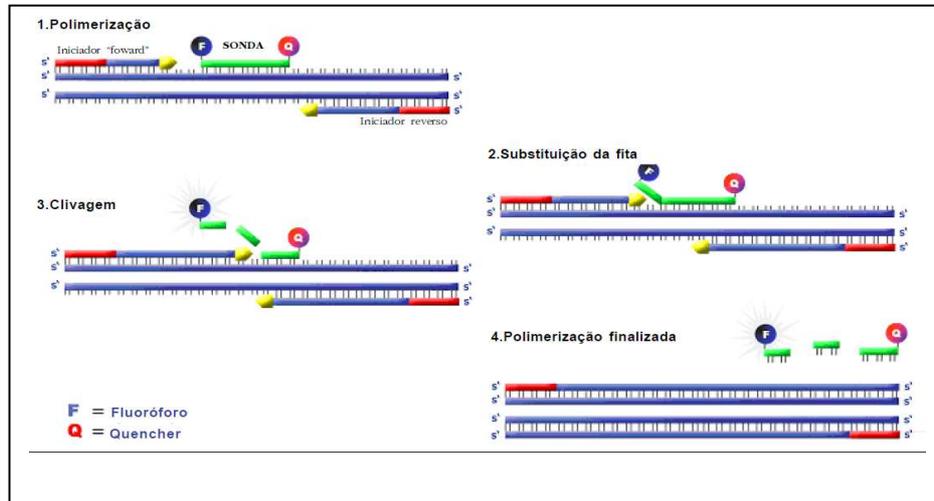


Figura 4. PCR em Tempo Real com sonda TaqMan mostrando as etapas da reação.

Fonte: Novais; Pires-Alves; Silva. 2004

A reação com TaqMan é considerada um método sensível para determinar a presença ou ausência de seqüência específicas (NOVAIS; PIRES-ALVES, SILVA, 2004).

A qPCR permite, basicamente, a realização de três tipos de ensaios, dentre eles: de quantificação absoluta, quantificação relativa e análise de Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Estudos que envolvem quantificação absoluta são aqueles onde é possível quantificar, com precisão e uso de unidade de medida, alvos específicos. Como ferramenta diagnóstica, a quantificação absoluta pode ser utilizada para detecção da infecção e quantificação de seu agente etiológico. O ensaio de quantificação absoluta baseia-se na análise da curva-padrão (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

Para o estabelecimento de uma curva padrão é necessário preparar padrões absolutos de quantidades conhecidas do gene alvo, diluídos em série. O DNA plasmidial e o RNA transcrito *in vitro* são comumente utilizados como padrões e deve ser diluído em concentrações padrões semelhante ao alvo nas amostras biológicas (BUSTIN, 2000; APPLIED BIOSYSTEMS, 2007). É por meio destes dados, ou seja, quantidades conhecidas de DNA, que o *software* efetua a quantificação de DNA alvo nas amostras em teste (Figura 5) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2007).

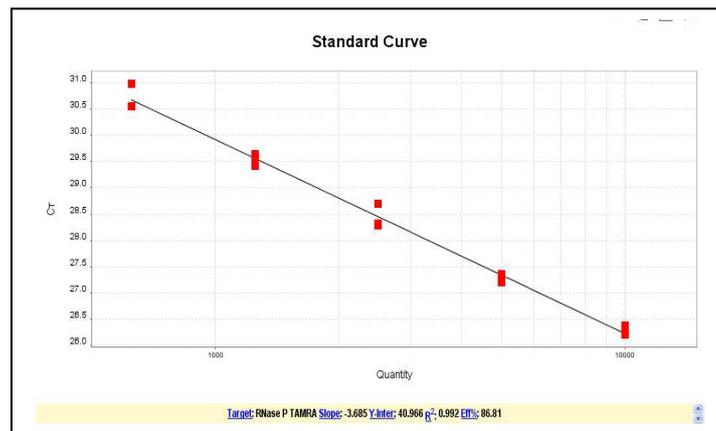


Figura 5. Interface do *software* ABI PRISM 7500 SDS (versão 2.0.4) mostrando a curva-padrão do ensaio de quantificação absoluta. Os pontos vermelhos representam os *Cts* gerados pelo número de cópias de cada concentração de DNA padrão.
Fonte: Applied Biosystems (2007)

A representação da curva padrão através da amplificação da reação de qPCR é chamada de curva de amplificação e é reproduzida por um gráfico, em que o eixo das abscissas representa o número de ciclos e o eixo das ordenadas a variação da fluorescência detectada (Figura 6). Essa curva é didaticamente dividida em 3 fases principais (considerando uma reação com 40 ciclos): fase linear, fase exponencial e fase de platô. A fase linear é a fase, entre os ciclos 1 a 12 em média, onde as amplificações ainda não são totalmente específicas e o número de seqüências alvo amplificadas ainda não dobra a cada ciclo (GOMES, 2011). A fase exponencial é assim chamada, pois, é nessa fase que a reação tem a duplicação da quantidade de seqüências alvo a cada ciclo, isso quando a reação tem próximo a 100% de eficiência (ideal > 90%). Essa fase acontece entre os ciclos 12 e 35 da reação (GOMES, 2011). A última das fases é a de platô, cuja reação atinge o máximo platô nas amplificações, que ocorre, sobretudo pelo fato dos reagentes começarem a ser exauridos. Essa etapa final acontece por volta dos ciclos 35 ao ciclo 40 (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010).

Um importante conceito referente às reações de qPCR é o *Ct* que é a abreviação para *cycle threshold* representando o ciclo em que a amostra atinge o limite de positividade. Isso porque aproximadamente no primeiro 1/3 da fase exponencial é estabelecido o limite onde a partir daquele ponto as amostras que cruzarem essa linha são consideradas positivas (GOMES, 2011; NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004).

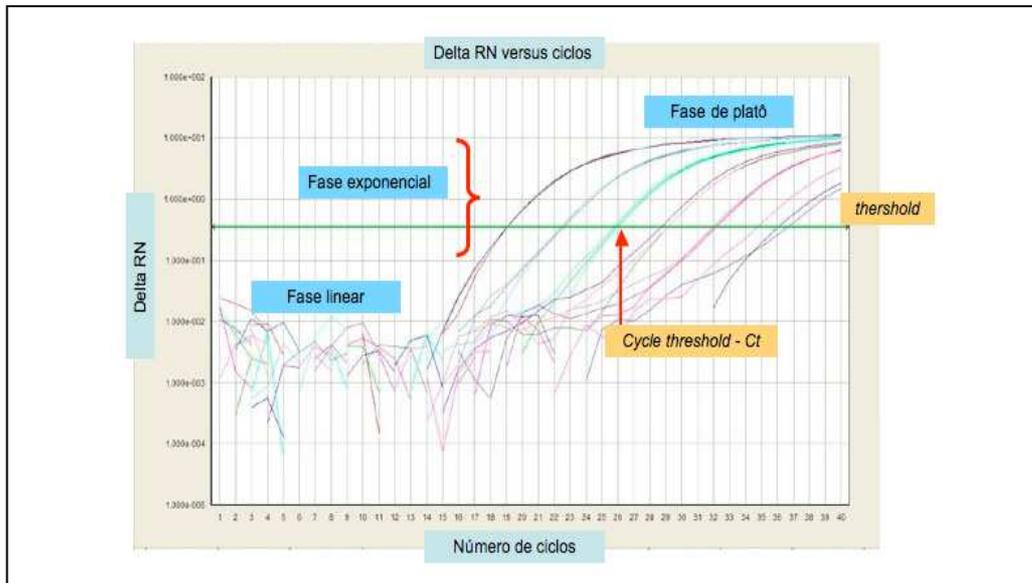


Figura 6. Curva de amplificação de uma reação de qPCR
Fonte: Gomes (2011)

É a partir da curva padrão que se calcula a eficiência da reação de qPCR de acordo com fórmula $[10^{(1/\text{slope})}] - 1$ (TOO et al., 2003).

O *slope* é o indicador da amplificação real, representa o coeficiente angular da reta gerada no gráfico composto pelo logaritmo da concentração (eixo das abscissas) e o valor de Ct (eixo das ordenadas) (GOMES et al., 2011).

Alguns procedimentos são importantes para que a reação de qPCR tenha a máxima eficiência. A utilização de pipetas calibradas ou mesmo de pipetadores automáticos maximizam a precisão das amostras (VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). O uso de, no mínimo, duplicatas de cada amostra, controles positivos (esses devem ser repetidos em cada placa de reação - as mesmas amostras), controles negativos, são exemplos de condição essenciais.

1.9.2.1 PCR em Tempo Real no Diagnóstico da Tuberculose

Um crescente número de artigos publicados demonstra a utilidade da qPCR na detecção do DNA relacionada de microorganismos de interesse na saúde pública (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010). A elevada sensibilidade e especificidade, associada a um curto tempo para liberação dos resultados, tem feito da qPCR uma

metodologia atrativa na substituição da cultura e dos ensaios baseados em antígenos (ESPY et al, 2006).

No que se refere à aplicabilidade dessa técnica na detecção do *Mycobacterium tuberculosis*, com finalidade de diagnóstico, está sendo avaliada para diferentes formas de TB, tais como: pulmonar (LEMAÎTRE et al., 2004; HILLEMANN et al., 2006) ganglionar (VAN COPPENRAET et al., 2004), óssea (KOBAYASHI et al., 2006) meníngea (TAKAHASHI;NAKAYAMA, 2006) e extrapulmonar (BURGRAFF et al., 2005; POUNDER; ALDOUS; WOODS, 2006).

No entanto, a aplicação da qPCR no estudo do DNA do *Mycobacterium tuberculosis* apresenta algumas limitações importantes: a) no que diz respeito à impossibilidade de fazer a distinção entre organismos vivos e mortos, gerando resultados falso-positivo; b) no monitoramento da eficácia terapêutica devido a persistência do DNA de *Mycobacterium tuberculosis* até 12 meses depois de iniciado o tratamento e seis meses após a baciloscopia e cultura terem negativado, pacientes com tuberculose pulmonar (BOLELLA et al., 1999; HELLYER et al., 1996; LI et al, 2010; MIDVANI et al., 2009; THOMSEN et al, 1999). Diante dessas restrições, os avanços em busca de uma técnica que permitisse detectar não somente o DNA, mas também, a viabilidade do *Mycobacterium tuberculosis*, fez com que pesquisadores aplicassem a técnica de transcrição reversa seguida de PCR em tempo Real na detecção e quantificação do RNA mensageiro (RNAm), uma vez que um sinal positivo do RNAm indica a presença de um organismo recentemente viável (MARTÍNEZ, 2009).

1.9.3 RT-qPCR (Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em Tempo Real)

Recentemente, com o surgimento da medicina molecular, a RT-qPCR tem sido usada na quantificação dos níveis de RNA no diagnóstico clínico. Tais aplicações são abrangentes e inclui estudos de regulação e expressão de marcadores de resistência a drogas em células tumorais (RAMACHANDRAN; MELNICK, 1999), monitoramento da resposta ao tratamento específico da tuberculose (DESJARDIN, et al. 1999), avaliação molecular do estágio de células tumorais em pacientes com câncer (BUSTIN; DORUDI 1998; GHOSSEIN; ROSAI 1996).

Seu principal diferencial é que a amplificação não parte de um molde de DNA diretamente extraído da amostra e sim de um RNA extraído, que é convertido em cDNA (DNA complementar). Ferramenta útil em estudos de expressão gênica, pois avaliando o

RNAm, é possível detectar quais proteínas estão sendo efetivamente expressas. No entanto, o estudo direto do RNA (principalmente o RNAm) é inviável, devido à sua alta sensibilidade a vários fatores e a altas temperaturas. A RT-qPCR é composta de duas etapas: a transcrição reversa e a amplificação propriamente dita. O primeiro passo da reação consiste na síntese de fita de cDNA antisense (complementar e reversa) em relação ao mRNA pela ação de uma enzima DNA polimerase RNA-dependente (transcriptase reversa). Depois de completada a reação de transcriptase reversa e do cDNA ter sido gerado, inicia-se a etapa da PCR em tempo Real utilizando como alvo o cDNA (FRAGA; MEULIA; FENSTER, 2008). Uma das limitações para o emprego da RT-qPCR está relacionada à qualidade do RNAm alvo, uma vez que ele é extremamente vulnerável (BUSTIN et al, 2000). É susceptível à degradação por RNases (ribonucleases), que são proteínas altamente estáveis e persistentes. Alguns métodos de purificação de RNA podem co-extrair altos níveis de proteínas – incluindo RNases. Proteínas co-extraídas e/ou RNA degradados podem acarretar em resultados errôneos na PCR em tempo real. O RNA extraído que apresenta valor de Absorbância $260/280 \geq 2,0$ é considerado relativamente livre de proteínas. O manuseio, processamento e armazenamento do RNA são extremamente importantes para garantir a integridade do mesmo (NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006).

Em alguns casos as reações de RT e PCR podem ser combinadas em uma única reação. Há vantagens e desvantagens para esses tipos de procedimentos. O emprego de uma única etapa minimiza erros e variações, entretanto, como o RNAm é rapidamente degradável, tendem a apresentar menor sensibilidade quando comparadas normalmente com os resultados obtidos em duas etapas (BUSTIN, 2000) .

Já a reação em duas etapas permite que diversas determinações sejam realizadas a partir de um RNAm e de seu cDNA correspondente. Este cDNA é estável e pode ser estocado. A grande vantagem do emprego da reação em duas etapas é a reprodutibilidade dos experimentos, uma vez que a RT apresenta variações de eficiência do rendimento (NOLAN; HANDS; BUSTIN; 2006).

Uma primeira abordagem nesse assunto no diagnóstico da Tuberculose envolveu a RT-qPCR para a detecção da molécula alvo RNA mensageiro (RNAm) em amostras de escarro de pacientes submetidos ao tratamento específico. O estudo desenvolvido por DESJARDIN e colaboradores (1999) analisou a técnica no acompanhamento do tratamento da tuberculose através da detecção dos níveis de RNA mensageiro (RNAm), ribossomal RNA (rRNA), e DNA genômico em amostras de escarro de pacientes comparando os resultados com os métodos convencionais de diagnóstico. Os resultados indicam que os níveis de RNAm

85B diminuíram após o início da terapia, assim como as colônias de *M. tuberculosis* viáveis na cultura, apresentando 90% dos pacientes com resultados negativos para ambos os marcadores após 2 meses de tratamento. Confirmando a hipótese de que o RNAm é um bom indicador de viabilidade microbiana e marcador de cura de pacientes submetidos ao tratamento.

A partir deste trabalho vários pesquisadores voltaram sua atenção na aplicação da tecnologia do qPCR na quantificação do RNAm que codifica a proteína 85B do *M. tuberculosis* (HU Y et al., 2000; JOU et al., 1997; LI et al., 2010; MIDVANI et al., 2009). Esses estudos têm apresentado o gene 85B (antígeno alfa) presente no complexo de *Mycobacterium tuberculosis*, como indicador de viabilidade celular e atividade metabólica. Possuindo um tempo de vida curto, quando comparado com os genes que codifica o rRNA e o DNA genômico. Desse modo, um sinal positivo de RNAm indica a presença de um organismo recentemente viável (JOU NAINN-TSYR et al., 1997).

O antígeno 85 é um complexo de três proteínas relacionadas: 32 kDa (antígeno 85A e 85C) e de 30kDa que contém o antígeno 85B. Esse gene é responsável pela produção de uma proteína que apresenta como característica uma expressão abundante (41% em relação ao gene 85A e 85C) em meio de cultura e fagócitos mononucleares em humanos (ARMITIGE et al., 2000). Embora a quantidade atual de RNAm em uma única célula seja desconhecida, estima-se que de 1 a 10 cópias do RNAm 85B esteja presente por célula no cultivo de *M. tuberculosis* (cepa de referência H37Rv). Todas as proteínas mostram propriedades ligadoras de fibronectina do plasma e células e atuam como micoliltransferases envolvidas nos estágios finais da construção da parede celular de todas as micobactérias, como também apresentam um papel na interação entre o bacilo e a infecção do hospedeiro (ARMITIGE et al., 2000; BENTLEY-HIBBERT et al., 1999; OHARA et al., 1997).

Sabe-se que moléculas de RNA bacteriano apresentam vida-média extremamente curta mais vulnerável à destruição do que as moléculas DNA genômico e, portanto, a detecção desse ácido nucléico reflete organismos vivos.

2 JUSTIFICATIVA

A falta de um diagnóstico rápido e eficaz para a tuberculose (TB) impede o manejo adequado do paciente e o controle da doença (PARASHAR et al., 2006). As técnicas diagnósticas microbiológicas convencionais, baciloscopia e cultura, são pouco sensíveis e laboriosas respectivamente. A comprovação bacteriológica torna-se ainda mais difícil nos casos onde a doença está associada a outras enfermidades e nas formas paucibacilares (JAMAL; MOHERDAUI, 2007; LIMA et al., 2009).

O período de tratamento prolongado que resulta na dificuldade de aderência aos esquemas terapêuticos promove a transmissão da doença e conduz ao surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes às drogas. Novos tipos de tratamentos etiológicos estão surgindo, porém testes para novos fármacos e para avaliar a resposta ao tratamento específico são dispendiosos, particularmente com a necessidade do monitoramento prolongado (BRASIL, 2010).

Desta forma, um marcador que refletisse precisamente a efetividade antimicrobiana seria certamente um grande avanço na avaliação da resposta às drogas experimentais e às do esquema padrão. A avaliação da quimioterapia no sentido de fornecer um meio mais rápido com poder de determinar se o esquema terapêutico é apropriado para o paciente, é particularmente importante devido ao aumento da prevalência de cepas multidrogarresistentes do *M. tuberculosis* (MDIVANI et al, 2009).

A maioria dos casos de multirresistência no mundo é adquirida por tratamentos irregulares e abandono. No Brasil, 96% dos casos de resistência notificados são adquiridos, sendo que mais da metade tem um histórico de três ou mais tratamentos prévios para TB, com lesões cavitárias bilaterais em 65% dos casos, e coinfeção pelo HIV de 7% (BRASIL, 2010). Para o tratamento desses casos, é necessário o uso de medicamentos injetáveis e de fármacos de reserva, com duração de 18 a 24 meses, cuja efetividade é de aproximadamente 60% (BRASIL, 2010).

A dificuldade de se detectar a resistência inicial a drogas, devido a não-realização do Teste de Sensibilidade para casos suspeitos (como nos pacientes HIV positivos) conduz a tratamentos inadequados dos portadores de Tuberculose Multirresistente, levando a um aumento no tempo de disseminação de bacilos resistentes (VIEIRA et al., 2008).

Os métodos mais comuns para monitorar a resposta ao tratamento anti-TB se baseia na redução progressiva do número de bacilos no esfregaço de escarro e na conversão negativa da cultura de *M. tuberculosis*. Estes métodos apresentam algumas desvantagens. Metade de todos

os novos casos de TB pulmonar, no início da doença apresenta baciloscopia negativa, o desaparecimento dos bacilos através do esfregaço de escarro é geralmente prolongado e a coloração não distingue os microorganismos viáveis dos não viáveis. A conversão da cultura positiva para negativa necessita de 1 a 2 meses depois de iniciado o tratamento e se correlaciona com a atividade esterilizante das drogas administradas, ou seja, com a morte completa do *M. tuberculosis* nos tecidos, sendo considerada o melhor preditor do sucesso do tratamento (DESJARDIN et al., 1999). Entretanto, devido ao crescimento lento do bacilo, esta medida pode ser determinada apenas semanas ou meses depois do tratamento.

Avanços nas técnicas de Biologia Molecular e a informação proporcionada pelo sequenciamento do genoma completo de micobactérias tuberculosas estimularam o desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico rápido da tuberculose (PALOMINO, 2005). Entre as várias técnicas moleculares atualmente aplicadas no diagnóstico da tuberculose, a PCR em Tempo Real quantitativa se destaca pela rapidez, maior precisão, reprodutibilidade e acurácia na detecção da doença (PARASHAR et al., 2006).

Vários ensaios utilizando as sequências de rRNA ou DNA como alvos para amplificação tem sido descritos para o diagnóstico de TB. Entretanto estas técnicas não tem sido aplicadas com sucesso para o monitoramento da eficácia terapêutica devido a persistência de ácidos nucléicos amplificados mesmo após a baciloscopia e cultura tornarem-se negativas. A análise semiquantitativa do rRNA tem sido usada para reduzir o tempo requerido em testar a susceptibilidade antimicrobiana do *M. tuberculosis*, embora sejam necessários cerca de 5 dias para discriminar cepas resistentes a algumas drogas. Estudos promissores utilizando a qPCR para avaliar a expressão do gene 85B através do RNAm do *M. tuberculosis* durante o tratamento específico, representam um avanço na detecção dos bacilos que causam a infecção, uma vez que um sinal positivo do RNAm indica a presença de um organismo recentemente viável. Devido a meia vida do RNAm da bactéria ser extremamente curto comparado com o rRNA ou DNA genômico, testes que usem como alvo o RNAm refletem melhor a viabilidade micobacteriana (DESJARDIN et al., 1999); desse modo, poderá detectar bacilos ainda em atividade metabólica durante o tratamento da tuberculose, poucos dias após ter iniciado o tratamento. (GOMES, 2008; NOVAIS et al., 2004; PARASHAR et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2006). Nesse contexto, a possibilidade de poder detectar a carga bacteriana através da detecção quantitativa de RNAm, certamente representaria um avanço no monitoramento da terapia da tuberculose, interrompendo precocemente a transmissão de cepas multidrogarresistente (DESJARDIN et al., 1999; LI et al., 2010; MIDVANI et al., 2009).

O presente estudo visa avaliar a detecção do RNAm 85B como um marcador para a viabilidade micobacteriana e demonstrar a possibilidade de quantificação através da RT-qPCR, com o objetivo de discriminar cepas de Mtb sensíveis e resistentes às principais drogas utilizadas no tratamento específico. Assim, a distinção entre essas cepas certamente trará um impacto importante para a saúde pública, principalmente devido ao surgimento de organismos multidrogarresistentes, bem como a alta taxa de mortalidade associada a co-infecções. O RNAm de organismos procariontes, ao contrário do DNA e rRNA, é rapidamente degradado, com um tempo de vida útil de aproximadamente 3 minutos, permitindo que exerçam sua função apenas no intervalo de tempo necessário. Desta forma, métodos baseados na amplificação do RNAm estão sendo propostos para serem utilizados na detecção de organismos viáveis, sendo considerado como um bom indicador de susceptibilidade as drogas antimicrobianas e da eficácia terapêutica, além de se poder avaliar a atividade bactericida de novas drogas e prevenir o aparecimento de cepas multidrogarresistentes (DESJARDIN et al., 1999, MIDVANI et al., 2009, LI et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar o desempenho da RT-qPCR utilizando o RNAm como alvo para o *Mycobacterium tuberculosis* na resposta ao tratamento específico da tuberculose pulmonar.

3.2 Específicos

- a) Otimizar as condições do método RT-qPCR utilizando como alvo o gene 85B da cepa de referência H37Rv do *Mycobacterium tuberculosis*;
- b) Aplicar a tecnologia de RT-qPCR desenvolvida por Desjardin *et al.*, (1999) em pacientes com TB pulmonar do estado de Pernambuco;
- c) Avaliar o desempenho da RT-qPCR em relação ao padrão ouro;
- d) Analisar o grau de concordância entre a cultura e a RT-qPCR antes e depois do início da terapêutica específica;
- e) Determinar os níveis da carga bacilar dos pacientes antes e depois do início da terapêutica específica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo prospectivo que utilizou uma amostra de conveniência para avaliar, sobretudo o desempenho da técnica RT-qPCR utilizando o RNAm na detecção do *Mycobacterium tuberculosis* como marcador de cura de pacientes com Tb pulmonar submetidos ao tratamento etiológico.

4.2 Local de estudo

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Imunoepidemiologia do CPqAM/FIOCRUZ. Os pacientes do estudo foram provenientes de ambulatórios e/ou enfermarias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Hospital Geral Otávio de Freitas, Unidade de Saúde Joaquim Cavalcanti do Distrito Sanitário I da Secretaria de Saúde do Recife os quais fazem parte do Sistema Único de Saúde/SUS e recebem pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar e outras afecções respiratórias.

4.3 Classificação dos pacientes:

Foram selecionados 98 pacientes com idade superior a 15 anos, de ambos os sexos, que procuraram o ambulatório ou enfermaria das instituições acima referidas com suspeita de tuberculose pulmonar. Os pacientes que foram considerados suspeitos de ter TB foram aqueles que apresentaram dois ou mais dos seguintes sintomas - perda de peso, imagem radiológica sugestiva de TB, tosse por mais de 15 dias, febre prolongada não esclarecida, sudorese noturna. Os pacientes inicialmente suspeitos, após definição diagnóstica, foram classificados como segue:

Grupo 1 - TB doença (56 pacientes): Pacientes cuja confirmação diagnóstica foi feita através da positividade da cultura associada a um conjunto de critérios clínicos e epidemiológicos e/ou resposta ao tratamento específico.

Grupo 2 - Não TB (42 pacientes): Pacientes com afecções pulmonares inespecíficas, com resultados negativos para *M. tuberculosis* através da baciloscopia, cultura e radiologia de tórax de TB.

4.4 Considerações Éticas

Os participantes da pesquisa ou os seus responsáveis foram informados verbalmente pelo médico assistente ou pesquisador principal e após a concordância em participar do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Foi preenchido um formulário padronizado, onde constava: identificação, procedência, características do domicílio, escolaridade, dados epidemiológicos, queixas principais, tempo de duração da doença, história de tratamento prévio, exame físico, dados laboratoriais e evolução da doença (Apêndice B).

As entrevistas foram realizadas pela pesquisadora do projeto, sob orientação e supervisão do médico assistente do serviço de saúde.

Os pacientes foram informados que a recusa em participar não teria nenhuma implicação quanto ao seu atendimento, acompanhamento médico ou tratamento.

A todos os indivíduos participantes do estudo foi assegurado a confiabilidade quanto aos resultados dos exames ou quaisquer outros dados obtidos durante o período de acompanhamento.

Os pacientes foram informados através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que os espécimes biológicos coletados iriam ser congelados e armazenados no banco de amostras existente no laboratório de Imunoepidemiologia do CPqAM/FIOCRUZ, caso fosse necessário a realização de estudos posteriores.

O referido projeto foi submetido à apreciação da Comissão de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, obtendo parecer favorável (Nº **38/2009**) e **registro no CAEE: 0016.0.095.000-09** (Anexo).

4.5 Acompanhamento do Paciente

A confirmação diagnóstica, prescrição do tratamento e monitoramento dos pacientes foram realizadas pelo médico acompanhante do serviço de saúde. De cada paciente foram coletadas amostras de escarro para investigação da tuberculose através dos exames de rotina (baciloscopia e cultura), no ambulatório ou enfermaria. Os exames de microscopia direta do escarro foram realizados por técnicos, no Laboratório de Saúde da Prefeitura do Recife e nos laboratórios de referência do Hospital das Clínicas e Hospital Geral Otávio de Freitas. As culturas foram feitas por técnico treinado no Laboratório de Nível NB3 do CPqAM/FIOCRUZ e a RT-qPCR pela pesquisadora principal no Laboratório de

Imunoepidemiologia do CPqAM. Todas as técnicas foram realizadas de maneira cega, ou seja, sem conhecimento dos resultados de outros exames realizados nem do diagnóstico final do paciente.

Todos os pacientes portadores de TB pulmonar tiveram amostras de escarro coletadas antes do início do tratamento anti-TB e com 15 e 30 dias de terapêutica, a fim de serem submetidas aos exames de cultura e RT-qPCR no laboratório do CPqAM.

Todos os pacientes com diagnóstico confirmado de TB pulmonar e sem tratamento prévio receberam o esquema terapêutico de primeira linha recomendado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010).

4.5.1 Critérios de Exclusão:

Foram excluídos os pacientes que:

- a) Não foi possível a realização da coleta de escarro espontâneo ou induzido;
- b) Fizeram uso prévio de tratamento anti-TB;
- c) Apresentaram irregularidade na tomada dos quimioterápicos prescritos;
- d) Abandonaram o tratamento.

4.5.2 Critérios de Perda

- 1) Pacientes que foram a óbito durante a pesquisa antes da definição diagnóstica;
- 2) Não retornaram ao Serviço de Saúde para acompanhamento clínico;
- 3) As amostras coletadas foram insuficientes para o processamento no laboratório ou acondicionadas de maneira inadequada.

4.6 Coleta e processamento dos espécimes biológicos

4.6.1 Pacientes de Enfermaria e Ambulatório

Foi coletado, no mínimo, 1ml de escarro de cada paciente antes do tratamento específico dia 0, e após o início da terapia dia 15 e 30 (de acordo com a produção de escarro). As amostras coletadas dos pacientes foram estocadas a 4° C, não mais que 48 horas e

transportadas para o CPqAM para serem processadas.

4.6.2 Descontaminação das amostras biológicas:

As amostras de escarro foram descontaminadas seguindo as informações do protocolo do Método de Petroff (NaOH 4%) (BARRETO, 1994).

4.7 Métodos diagnósticos convencionais

4.7.1 Baciloscopia

O protocolo de coloração pelo método de Ziehl-Neelsen para a identificação e quantificação do BAAR foi realizado de acordo com as normas técnicas do Manual Nacional de Vigilância da Tuberculose e outras Micobactérias, MS, 1ª edição, 2008.

4.7.2 Cultura e Identificação de micobactérias em meio Löwenstein-Jensen

Para a identificação das micobactérias, 200µl da amostra de escarro descontaminado foi dividido e semeado em três tubos contendo o meio Löwenstein-Jensen: 1) um tubo de meio Löwenstein-Jensen (simples) que identifica o gênero *Mycobacterium*; 2) um tubo de meio Löwenstein-Jensen com PNB (ácido para-nitrobenzóico) que identifica cepas de Micobactérias atípicas; 3) um tubo de meio Löwenstein-Jensen com TCH (Hidrazida do ácido 2 carboxílico) para identificar a espécie *Mycobacterium tuberculosis*. Os tubos foram colocados em estufa a 37°C e avaliados uma vez por semana até a 8ª semana, ou antes, desde que apresentassem positivos (crescimento de colônias em algum tubo). Os meios de Löwestein-Jensen (simples, PNB e TCH) foram preparados pela equipe do Laboratório de Imunoepidemiologia do CPqAM/FIOCRUZ. Todos os meios preparados passaram por testes de esterilidade (estufa a 37°C sem inoculação de amostra) e controle de qualidade do meio (inoculação de cepa de referência H37Rv de *M. tuberculosis*), seguindo o Manual Nacional de Vigilância da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008).

4.8 Métodos Moleculares

4.8.1 Alvo molecular

O alvo molecular do estudo é uma região do gene 85B presente no complexo antigênico da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis* codificado pela expressão do RNA mensageiro (HELLYER et al., 1996).

4.8.2 Extração do RNAm do gene 85B do *Mycobacterium tuberculosis*

A extração de RNA das amostras de escarro foi realizada com o reagente TRIZOL (Invitrogen), segundo instruções do fabricante com algumas modificações. Na etapa inicial, para romper a membrana celular, foi necessário utilizar o sistema de congelamento e descongelamento com nitrogênio líquido da seguinte maneira: Para cada 500µl de amostra de escarro descontaminado, que estava armazenada a -70°C, foi utilizado 750µl de TRIZOL, divididos da seguinte maneira: 100µl de TRIZOL seguido de congelamento no nitrogênio líquido; descongelado e adicionado mais 250µl de TRIZOL; congelado novamente e adicionado 400µl do mesmo reagente. Com as amostras uma vez homogeneizadas, incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 200µl de clorofórmio e agitando vigorosamente com as mãos por 15 segundos, seguindo de uma incubação à temperatura ambiente por mais 10 minutos. Centrifugou-se a 10.400 rpm por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubos limpos após centrifugação e acrescentou-se 500µl de álcool isopropílico, deixando os tubos incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Após os 10 minutos, centrifugou-se a 10400 rpm por 10 minutos, a 4°C, e removido o sobrenadante, deixando apenas o pellet que foi lavado com 1ml de etanol a 75% e homogeneizado no vortex. Centrifugou-se esse material a 8600 rpm, por 5 minutos a 4°C. No final do procedimento, o sobrenadante foi descartado e o pellet colocado a uma temperatura ambiente por 10 minutos para secar. O mesmo foi ressuscitado em 20µl de água DEPC (Dietilpirocarbonato), e aquecido a 55°C por 10 minutos.

As amostras de RNA foram armazenadas a -70°C para uso posterior na realização da transcrição reversa.

4.8.3 Reação de Transcrição Reversa (RT)

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com o Kit SuperScript III First-Strand™ cDNA Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando: 2µl de RNA extraído, 2µl do *primer* reverso TB2 a 10pmoles, 1µl do dNTP mix (10mM) e 10µl de água DEPC, finalizando um volume de 15µl. Esse mix foi aquecido a 65°C por 5 minutos e colocado no gelo por 1 minuto. Uma mistura contendo 2µl do Buffer (10x), 4µl de MgCl₂ (25mM), 2µl de ditioneitol DTT (0,1 M), 1µl de RNase out (40U/µl) e 1µl da enzima transcriptase reversa SuperScript III RT (200U/µl) foi preparada e adicionada à primeira mistura contendo o RNA. Os tubos foram incubado a 50°C por 50 minutos e posteriormente a reação foi inativada a 85°C por 5 minutos. Após breve centrifugação, foi adicionado 1µl de RNase H em cada tudo por 20 minutos a 37°C para remoção do RNA molde da molécula cDNA:RNA. O DNA complementar (cDNA) sintetizado foi armazenado a -20°C até o momento de sua utilização.

Em cada reação dois controles negativos foram utilizados: os que são comumente chamados de controle sem alvo (*non template control* – NTC) com todos os reagentes, e um controle da Reação de Transcrição reversa sem a enzima transcriptase reversa SuperScript III RT para confirmar a ausência de DNA contaminante na amostra.

4.8.4 Subclonagem do alvo 85B para a construção da curva padrão

Para a obtenção do plasmídeo recombinante a ser usado na construção da curva padrão da RT-qPCR, foi realizada uma PCR convencional com os *primers* TB1 (5'-TCAGGGGATGGGGCCTAG - 3') e TB2 (5'- GCTTGGGGATCTGCTGCGTA - 3') descritos por Desjardin e colaboradores (1999), que geram um amplicon de 130pb do alvo 85B do *M. tuberculosis*.

A reação de amplificação para a obtenção deste amplicon foi feita em um volume final de 50µL, contendo 1µL de cDNA sintetizado de um RNA extraído da cultura de cepa de referência H37Rv de *M. tuberculosis*, 1U de *Taq* polimerase, 200µM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada primers e 1X Tampão de PCR (50mM KCL; 10mM Tris pH 9; Triton X-100 0,1%). As condições da reação foram: a fase de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, num total de 39 ciclos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos, conforme reação descrita no Kit

SuperScript III First-Strand™ cDNA Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Os produtos foram visualizados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio.

A purificação e reação de clonagem foram realizadas com o kit TOPO TA Cloning (Invitrogen Life Technologies, Califórnia, USA), seguindo, em parte, as instruções do fornecedor. Para a reação de clonagem foram utilizados 5µl do produto de PCR transcricional, 0,5µl de solução de sais (1,2M NaCl e 0,06M MgCl₂) e 0,5µl do vetor de clonagem pCR 4 TOPO (50% glicerol, 50mM Tris-HCL, pH7.4, 1mM EDTA, 2Mm DTT, 01% Triton X-100, 100ug/ml BSA e 30uM de fenol vermelho).

O DNA plasmidial foi extraído de acordo com o protocolo publicado e Sambrook, Fritish & Maniatis, 1989. O alvo molecular, 85B, da cepa de referência H37Rv de *M.tuberculosis* foi subclonado no vetor plasmidial pCR 4 TOPO tendo sido atribuído o nome p85B.

4.8.4.1 *Mini-prep de plasmídeos recombinantes*

Com o objetivo de usar o produto de clonagem como padrão nos experimentos posteriores foi necessário obter-se uma alta quantidade de material. Portanto foi realizada uma Mini-prep de plasmídeos recombinantes, seguindo o protocolo Mini Spin Kit Illustra para isolar o vetor pCR4 TOPO com o inserto p85B. O resultado final foi avaliado por espectrofotômetro e através da eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio.

O sequenciamento foi realizado para confirmação da sequência do fragmento clonado utilizando 10 ng de amplicon e 3,2 pmoles de cada iniciador (TB1 e TB2) em sequenciador de 16 capilares ABI 3100 (Applied Biosystems, CA, USA), utilizando o kit para sequenciamento BigDye Terminator vs 3.0 (Applied Biosystems, CA, USA) seguindo as indicações do fabricante. A análise das seqüências foi realizada através da comparação com as seqüências do banco de dados do NCBI, através do programa de alinhamento BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

O DNA plasmidial contendo o inserto de 130 pb foi quantificado por meio de um espectrofotômetro Nanodrop 2000C (Thermo Scientific).

4.8.5 Construção da Curva Padrão para a Quantificação Absoluta

A partir da quantificação inicial do DNA plasmidial foi construída uma curva padrão de diluições seriadas de fator 10 (100.000pg, 10.000pg, 1000pg, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0,001pg).

Para obter a quantificação absoluta estas concentrações de DNA plasmidial foram convertidas em número de cópias do alvo 85B por microlitro (cópias/ μ l) na reação de RT-qPCR, utilizando o auxílio do site <http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/0107.html>.

A amplificação e detecção da curva padrão foram realizadas paralelamente a amplificação das amostras que se quer quantificar sendo também aplicadas para a avaliação da sensibilidade de detecção da RT-qPCR.

Para a análise da curva de amplificação, que representa o sinal de fluorescência vs. o número de ciclos durante a reação, utilizou-se os parâmetros “*threshold*” (nível de fluorescência detectável) e “*baseline*” (limite pré-definido de ciclos de PCR) auto definidos pelo equipamento. Desta forma, os valores do ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial (*Ct*) foram mensurados pelo equipamento ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA),

A eficiência de amplificação (*e*) da molécula alvo foi calculada pela fórmula ($E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$).

4.8.6 Otimização da RT-qPCR

4.8.6.1 Diluição da concentração de primers e sonda

Os *primers* e sonda utilizadas nesse estudo foram desenhados com base no trabalho de Desjardin et al. (1999), porém a abordagem molecular não foi diferente, mas foi necessário uma reavaliação para os padrões atuais.

No estudo da padronização foi utilizada uma concentração de DNA plasmidial de 10.000pg. Foram realizadas diluições dos *primers* (TB1 e TB2) em cinco concentrações: 0,2pmol/ μ l, 0,3pmol/ μ l, 0,4pmol/ μ l, 0,5pmol/ μ l e a sonda (TaqMan) foi diluída nas concentrações de 0,15pmol/ μ l, 0,2pmol/ μ l, 0,25pmol/ μ l, 0,3pmol/ μ l e 0,35pmol/ μ l. De acordo com os valores de *Ct* das amostras positivas e controles negativos (NTC) foi selecionado uma concentração do *primer* e sonda para serem utilizadas na RT-qPCR.

Para confirmação dos resultados durante a etapa de padronização da técnica, foi efetuada eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (10 mg/ml) usando um marcador de peso molecular (100 bp Low DNA Mass Ladder - Invitrogen).

As bandas de DNA separadas através de eletroforese foram visualizadas em um transluminador de luz ultravioleta e fotografadas com um sistema de documentação Kodak (Gel Logic 100 Imaging System), utilizando o software Kodak molecular imaging software 4.0.0.

4.8.6.2 Condições da RT-qPCR

A RT-qPCR foi realizado no termociclador ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando o sistema TaqMan para detecção do produto de amplificação. Foram utilizados os *primers* (TB1: 5'-TCAGGGGATGGGGCCTAG-3' e TB2: 5'- GCTTGGGGATCTGCTGCGTA-3') que geram amplicons de 130pb da região do gene 85B do *Mycobacterium tuberculosis* (GenBank accession number X62398). As sondas foram compostas de duas moléculas: na extremidade 5' a molécula *reporter dye*, FAM (5-carboxifluoresceína - TCGAGTGACCCGGCATGGGAGCGT - TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina) na extremidade 3' a molécula *quencher*.

Cada reação teve volume final de 25 µl e foi composta de 12,5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) Applied Biosystems, 2 µl do cDNA, 1µl de cada primer (0,3pmol) e 0,2pmol da sonda, completado o volume com água DEPEC.

As condições da reação foram um ciclo de 50°C durante 2 minutos; um ciclo de 95°C durante 10 minutos; 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos e 68°C durante 1 minuto.

Em cada experimento de RT-qPCR, foram utilizados controles negativos e positivos distribuídos da seguinte forma:

1. Controles negativos: dois controles negativos da reação de RT-qPCR com todos os reagentes sem alvo (*non template control* – NTC); Um controle negativo da Reação de Transcrição reversa com todos os reagentes sem alvo (*non template control* – NTC) e um sem a enzima transcriptase reversa SuperScript III RT para confirmar a ausência de DNA contaminante na amostra.
2. Controles positivos: Curva padrão utilizada na reação 10.000pg, 1000pg, 100 pg, 10 pg.

Todas as amostras foram feitas em duplicata e o valor do *threshold* foi ajustado de acordo com o menor desvio padrão observado entre as duplicatas. Dessa forma, os valores de *Ct* determinado foram considerados os valores da média dos *Ct* (média das duplicatas).

A análise, interpretação e registro dos resultados do RT-qPCR foram efetuados com o auxílio do *software* ABI PRISM (versão 2.0.4 – Applied Biosystems).

4.9 Análise Estatística

Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas ou gráficos incluindo também o uso de algumas medidas descritivas como mínimo, máximo, média e desvio padrão. Para análise das variáveis com mais de dois grupos utilizou-se Bartlett para testar o pressuposto de homogeneidade das variâncias, aplicou-se ANOVA com post-hoc Tukey observado o pressuposto de homogeneidade. Na análise comparativa entre as variáveis qualitativas foi aplicado o teste kappa para a análise de concordância o teste qui-quadrado para a análise de associação, e quando necessário o teste de Fisher. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os Softwares utilizados foram o Excel 2000 e o R v2.10.0.

Visto que utilizamos uma amostra de conveniência, o *n* da amostra não foi previamente calculado para avaliarmos o desempenho da RT-qPCR na detecção do *M. tuberculosis* em amostras de escarro de pacientes com suspeita de TB.

A quantificação absoluta do alvo 85B nas amostras analisadas foi determinada pelos valores de *Ct* da curva padrão. Foram consideradas válidas, as amostras que apresentaram valores médios de *Ct* das duplicatas ≤ 34 (Applied Biosystems, 2004). As amostras que tiveram valores médios *Ct* maiores de 34 foram consideradas negativas e, portanto os valores das concentrações do alvo na reação foram considerados zero.

Os valores apresentados do número de cópias por microlito da RT-qPCR foram transformados em log na base 10.

5 RESULTADOS

5.1 Otimização da técnica de RT-qPCR

5.1.1 Avaliação da concentração de oligonucleotídeos e sonda

Os *primers* foram diluídos nas concentrações de 0,2 μ mol/ μ l, 0,3 μ mol/ μ l, 0,4 μ mol/ μ l, 0,5 μ mol/ μ l. Todas as diluições foram feitas em triplicata (Figura 7).

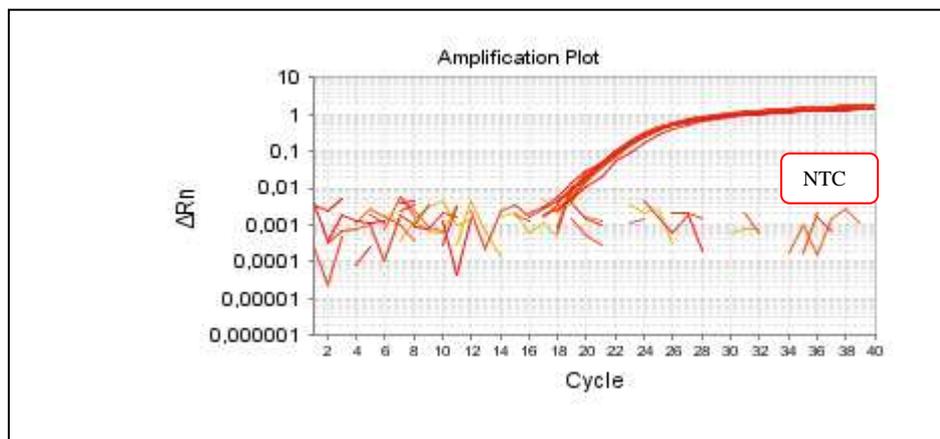


Figura 7 – Curva de amplificação de diferentes concentrações dos primers (TB1 e TB2) testadas com amostra de 10pg da curva de diluição do DNA plasmidial clonado.

Nota: NTC (controle negativo sem alvo).

No gel de agarose (Figura 8) podemos observar que os *primers* nas concentrações de 0,3 μ mol, 0,4 μ mol e 0,5 μ mol mostraram melhores amplificações, porém o selecionado foi 0,3 μ mol, o de menor concentração. Os iniciadores na concentração de 0,3 μ mol apresentaram um bom desempenho amplificando uma banda bem visível, o que nos permitiu escolhê-los.

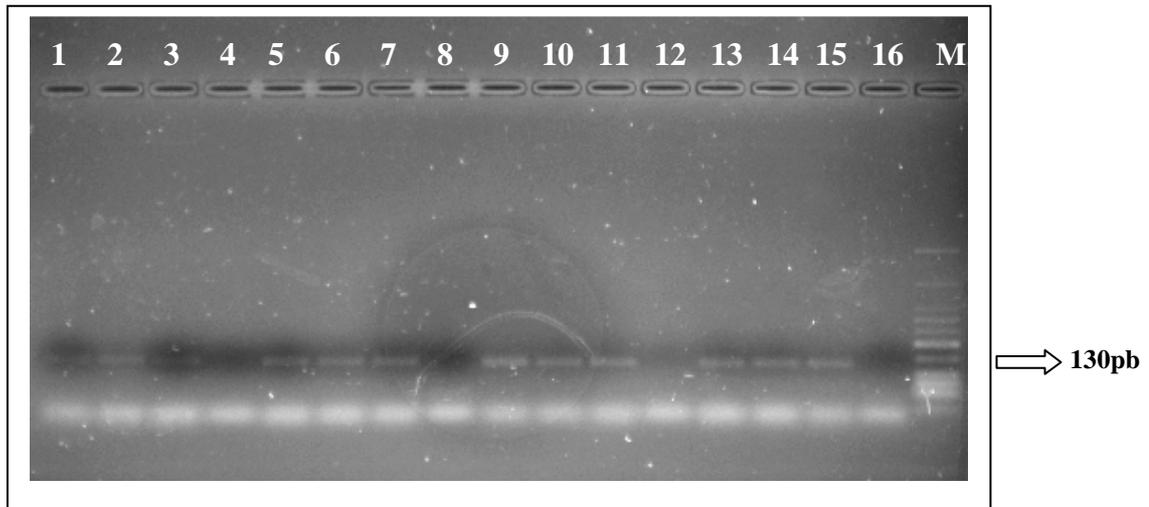


Figura 8 – Eletroforese do produto de RTqPCR. Poços 1,2,3: 0,2pmol; Poço 4: NTC; Poços 5,6,7: 0,3pmol, Poço 8: NTC; Poços 9,10,11: 0,4pmol; Poço 12: NTC; Poços 13,14,15: 0,5pmol; Poço 16: NTC. Marcador molecular de 100 pares de bases (pb).

Em relação à sonda (TaqMan) foram realizadas diluições nas concentrações de 0,15pmol/ μ l, 0,2pmol/ μ l, 0,25pmol/ μ l, 0,3pmol/ μ l e 0,35pmol/ μ l (Figura 9). Apesar da sonda na concentração de 0,15pmol ter apresentado um bom desempenho, uma concentração menor aumenta a possibilidade de amplificar produtos inespecíficos. Analisando a RT-qPCR em conjunto com a eletroforese (Figura 10), a concentração da sonda escolhida foi 0,2pmol que apresentou uma boa performance.

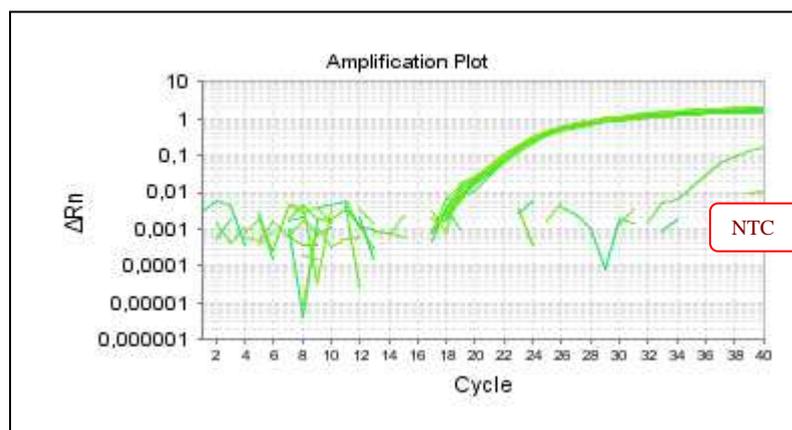


Figura 9 – Curva de amplificação de diferentes concentrações da sonda *TaqMan* testadas com amostra de 10pg da curva de diluição do DNA plasmidial clonado.

Nota: NTC (controle negativo sem alvo)

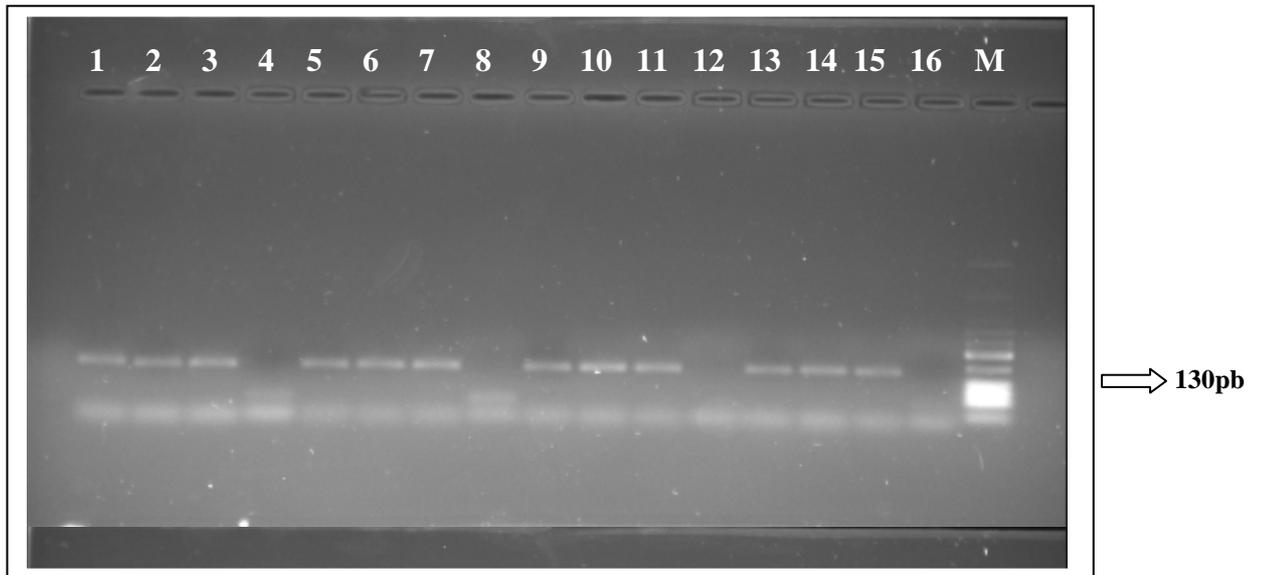


Figura 10 – Eletroforese do produto de RT-qPCR. Poços 1, 2, 3: 0,15pmol/μl; Poço 4: NTC; Poços 5,6,7: 0,2pmol/μl; Poço 8: NTC; Poços 9,10,11: 0,25pmol/μl; Poço 12: NTC; Poços 13,14,15: 0,3pmol/μl; Poço 16: NTC (controle negativo sem o alvo). Marcador molecular de 100pb - Low DNA Mass Ladder

5. 2 Curva–padrão a partir da subclonagem do alvo molecular 85B

A curva padrão foi construída, mantendo-se linear em 5 logaritmos da concentração de DNA plasmidial padrão, resultando um limite de detecção de 10pg do alvo (Figura 11).

Observou-se um coeficiente de correlação de 98% e eficiência da reação de 106% ($R^2 = 0,98$, $\epsilon = 106$ e slope = -3,18) (Figura 12).

Em relação ao número de cópias do alvo na reação a técnica variou de 7×10^{11} a $7 \times 10^7/\mu\text{l}$.

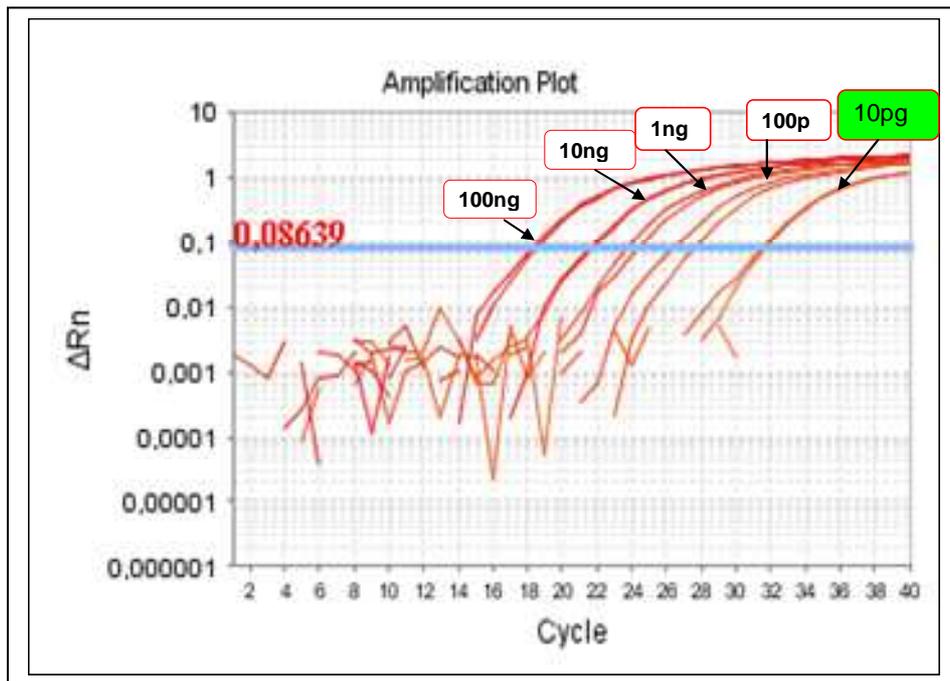


Figura 11. Curva de amplificação acima do “threshold” mostrando em ordem decrescente a diluição do DNA plasmidial correspondendo a 100.000pg Ct= 19,63, 10.000pg Ct=22,95, 1000pg Ct= 25,31, 100pg Ct= 28,30 e 10pg Ct= 32,5.
Nota: Amostras em duplicata.

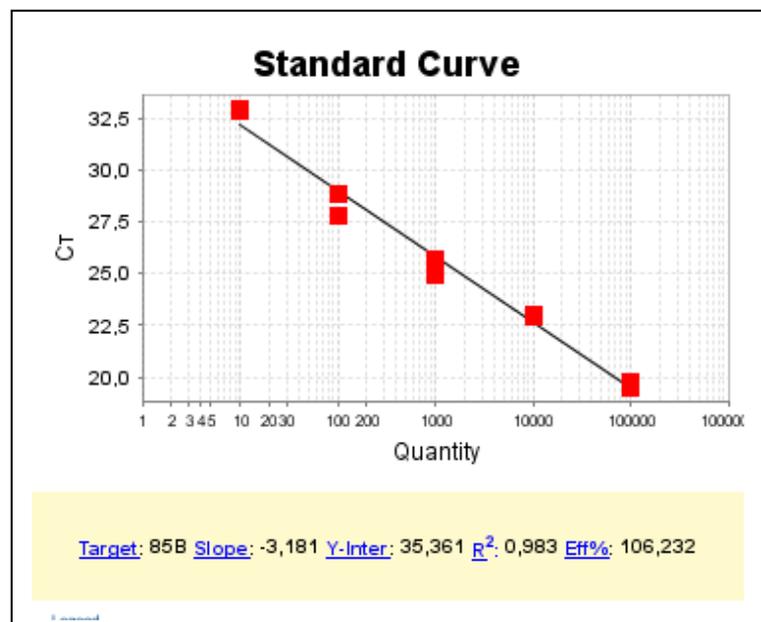


Figura 12 – Regressão linear a partir da curva padrão construída com concentrações conhecidas de DNA plasmidial variando entre 100.000pg a 10pg. Coeficiente de Correlação ($R^2=0,98$), eficiência de amplificação = 106% e slope=-3,18.
Nota: Amostras em duplicata.

5.3 Caracterização da população do estudo

Durante o período do estudo, foram analisados 98 indivíduos com suspeita clínica de tuberculose pulmonar. Desses, 59 (60.20%) era do sexo masculino e 39 (39.80%) do sexo feminino, idade variando entre 17 a 78 anos, com média de 40 anos +13,6. Todos os pacientes eram provenientes de instituições do Sistema Único de Saúde/SUS, sendo 73.47% procedentes de ambulatórios especializados. Do total de indivíduos selecionados, 56 (57.14%) apresentaram diagnóstico final de TB pulmonar e o restante, 42 (42.86%) eram portadores de doença respiratória inespecífica, de acordo com o parecer do médico do serviço de saúde, sendo considerados como o grupo “não TB”. Entre os 56 doentes, o diagnóstico bacteriológico foi confirmado em 51 (91,07%) por meio da cultura e em 5 através da associação de critérios clínicos, epidemiológicos, positividade da baciloscopia, alterações radiológicas e resposta à terapêutica específica. Neste grupo, a maioria dos pacientes (75,51%) apresentou na radiografia de tórax alterações no parênquima pulmonar, porém 24,49% não realizaram o referido exame. Todos os 56 indivíduos com TB doença receberam inicialmente o tratamento específico de primeira linha recomendado pelo Ministério da Saúde (2008). Destes, 54 (55.10%) pacientes responderam a terapêutica realizada, com boa resposta clínica e microbiológica, tendo recebido alta por cura, porém dois (2.04%) apresentaram resistência as drogas tuberculostáticas (Vide Tabela 1).

Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos 98 pacientes selecionados para o estudo com suspeita de tuberculose pulmonar.

	N	%
Diagnóstico		
TB pulmonar	56	57.14
Não TB	42	42.86
Sexo		
Masculino	59	60.20
Feminino	39	39.80
Procedência		
Ambulatório	72	73.47
Enfermaria	26	26.53
Rx de Tórax		
Alterações específicas	44	44,90
Sem alterações específicas	30	30,61
Não realizado	24	24,49
Tratamento anti - TB		
Esquema Básico (1ª linha)	56	57,14
Não realizado	42	42,86
Evolução		
Alta por cura	54	55.10
Resistente	2	2.04
Evolução não compatível com TB	42	42,86

Fonte: elaborado pela autora

5.4 Avaliação do desempenho para a detecção do *M. tuberculosis* através da baciloscopia, cultura e RT-qPCR no total de pacientes com suspeita de TB pulmonar

DOS 98 indivíduos selecionados para o estudo, foi coletada uma amostra de escarro de cada paciente e antes de iniciar qualquer tipo de terapêutica foram realizados os exames de baciloscopia, cultura e RT-qPCR. Deste total, 56 pacientes foram considerados portadores de TB pulmonar através da positividade da cultura, presença de critérios clínicos, epidemiológicos e/ou resposta ao tratamento específico tendo sido afastado a doença em 42 suspeitos. A baciloscopia foi positiva em 48 (49,0%), a cultura em 51 (52,04%) e a RT-qPCR

em 52 (53,06%) (Tabela 2). Considerando como padrão ouro a cultura, critérios clínicos epidemiológicos e/ou resposta terapêutica, a sensibilidade da baciloscopia foi de 85,71% (IC= 73,2 – 93,2) e especificidade de 100% (IC= 89,6 – 100) e da RT-qPCR foi de 91,1% (IC= 79,6 – 96,7%) e 97,6% (IC= 85,9 – 99,9%), respectivamente (Tabela 3). O valor de p para ambos os testes foi altamente significativo ($p < 0,0001$ pela correção de Yates).

Tabela 2. Resultados dos testes de baciloscopia, cultura e RT-qPCR no total de 98 pacientes com suspeita de TB pulmonar selecionados para a pesquisa

Exames	Resultados		Total de pacientes
	Positivo (%)	Negativo (%)	
Baciloscopia	48 (49,0%)	50 (51,0%)	98
Cultura	51 (52,04%)	47 (47,96%)	98
RT- qPCR	52 (53,06%)	46 (46,94%)	98

Tabela 3. Desempenho da Baciloscopia e RT-qPCR em 98 pacientes com suspeita de TB considerando a cultura associada aos critérios clínicos e/ou resposta ao tratamento específico como padrão ouro.

Exame	Sensibilidade	Especificidade
Baciloscopia	85,7%	100%
RT-qPCR	91,07%	97,61,%

$p < 0,0001$

Fonte: elaborado pela autora

5.5 Avaliações dos métodos de cultura e RT-qPCR como marcadores de viabilidade bacilar e no monitoramento da resposta à terapêutica específica nos 56 pacientes com tuberculose pulmonar

Os 56 pacientes com diagnóstico confirmado de tuberculose pulmonar foram avaliados durante 30 dias de regime terapêutico específico em relação à viabilidade bacilar e resposta terapêutica, através da cultura e RT-qPCR.

Foram coletadas amostras de escarro antes do início do tratamento específico, (ponto zero) e com 15 e 30 dias após. Das 56 amostras de escarro coletas no ponto zero (uma coleta para cada paciente), 51 (91,07%) foram positivas através da cultura e 5 (8,93%) negativas. Quando submetidas a RT-qPCR, 52 (92,86%) foram positivas e 4 (7,14%) negativas. Nas

duas semanas seguintes após o início da terapia anti-TB (dia 15), os exames de cultura e RT-qPCR negativaram em 43 (76,8%) pacientes e continuaram positivos apenas em 13 (23,2%), com uma excelente concordância entre os testes, demonstrados pelo índice de Kappa = 1 ($p < 0,001$). No dia 30 de esquema tuberculostático, 3 (5,35%) amostras permaneciam positivas na RT-qPCR e 2 (3,57%) na cultura, negativando em 54 (96,43%) amostras na cultura e 53 (94,64%) na RT-qPCR, tendo demonstrado uma boa concordância, com um índice de Kappa = 0,79 ($p=0,0019$) (Tabela 4). Em relação ao monitoramento da eficácia terapêutica os resultados da RT-qPCR foram paralelos aos das culturas, tendo-se observado uma conversão dos resultados dos testes de positivo para negativo nos pontos de coletas pré-determinados como mostra a Figura 13.

Tabela 4. Desempenho da cultura e da RT-qPCR no monitoramento da resposta à terapia específica em 56 pacientes com TB pulmonar antes (dia 0) e após início das drogas tuberculostáticas.

	Exames	Positivo (%)	Negativo (%)	Total de pacientes
DIA 0	Cultura	51 (91,07%)	5 (8,93%)	56(100%)
	RT- qPCR	52 (92,86%)	4 (7,14%)	56(100%)
DIA 15	Cultura	13 (23,2%)	43 (76,8%)	56(100%)
	RT- qPCR	13 (23,2%)	43 (76,8%)	56(100%)
DIA 30	Cultura	2 (3,57%)	54(96,43%)	56(100%)
	RT- qPCR	3 (5,36%)	53(94,64%)	56(100%)

Fonte: Elaborado pela autora

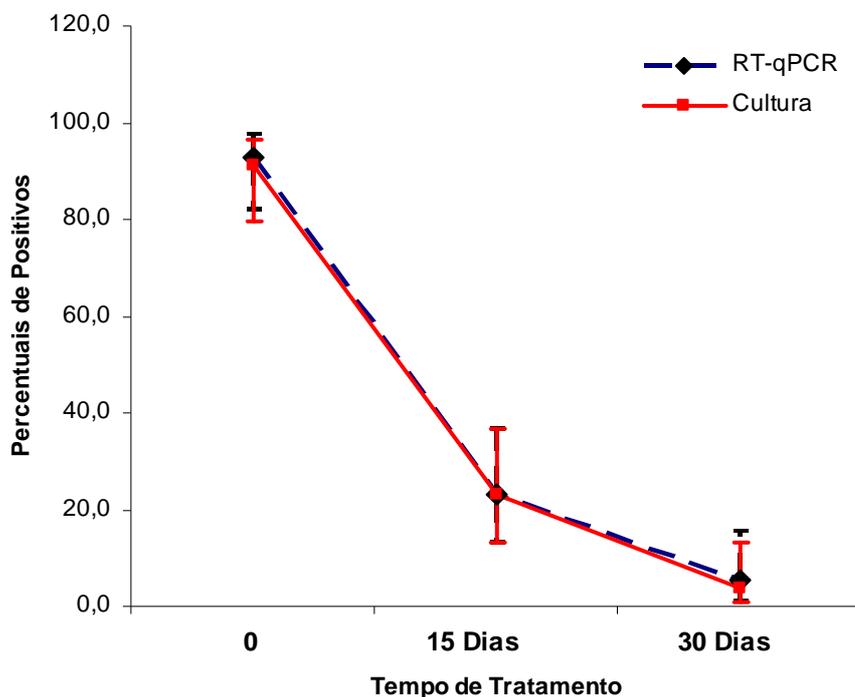


Figura 13. Conversão dos resultados de positivo para negativo da cultura e RT-qPCR durante o tratamento específico.

Nota: Dia 0, a cultura apresentou 91,07% de positivos e a RT-qPCR 92,86%; no dia 15 a cultura e RT-qPCR 23,2% e no dia 30, a cultura e RT-qPCR apresentaram 3,57% e 5,36% de positivos, respectivamente.

5.6 Quantificação do alvo 85B na RT-qPCR

A quantificação absoluta dos níveis de 85B mRNA na amostra de escarro foi realizada através da RT-qPCR nos 52 pacientes positivos no dia 0, e nos dias 15 e 30, nos pacientes em tratamento. As concentrações da carga bacilífera obtidas pelo *software* ABI PRISM (versão 2.0.4 – Applied Biosystems), foram representadas em picogramas/ μ l, calculadas a partir dos valores gerados nos *Ct* das amostras em relação aos *Ct* da curva padrão. Em seguida foram convertidas em número de cópias por μ l na reação de RT-qPCR. Os resultados obtidos estão apresentados no Apêndice A.

Assim, a quantificação do alvo 85B na reação revelou no dia 0, uma média de $8,5 \times 10^9$ cópias/ μ l, equivalente a $9,5 \log_{10}$. Enquanto que no dia 15 a média foi 6×10^8 cópias/ μ l igual a $2,6 \log_{10}$ e no dia 30, 3×10^8 cópias/ μ l ou $0,6 \log_{10}$, (Figura 14). A diferença nas

médias do log no dia 0 para o dia 15 e para o dia 30 foi altamente significativa ($p < 0,0001$ pela correção de Yates).

Do total de 52 pacientes analisados através da carga bacilar, apenas 3 tiveram quantificação dos níveis de 85B detectados até o dia 30, como mostra a figura 15. Dois deles (paciente 118/10 e 266/10) tiveram aumento da carga bacilar em um mês de tratamento em relação ao dia 0 e 15. No entanto, o paciente 23/11 apresentou uma redução da carga bacilífera, mas na amostra de escarro coletada no dia 30 os níveis de 85B ainda foram detectados (Apêndice C).

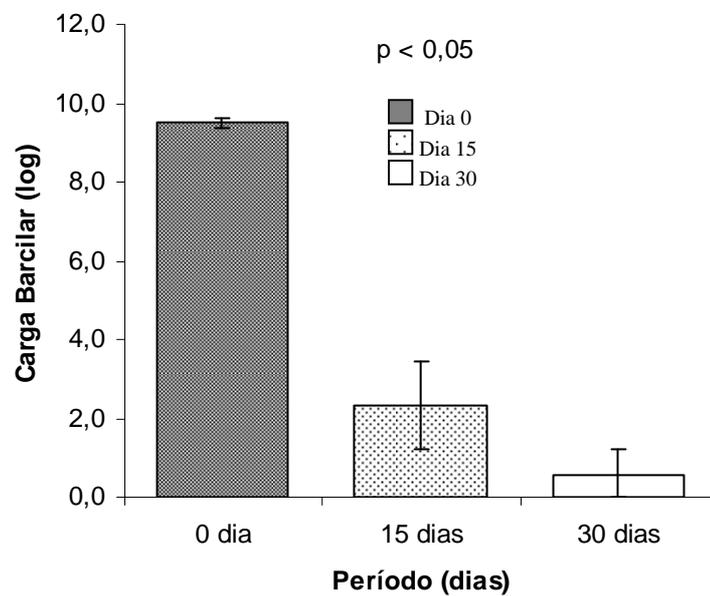


Figura 14. Média da carga bacilar do alvo 85B nos 52 pacientes monitorados durante os dias 0, 15 e 30 de tratamento anti-TB.

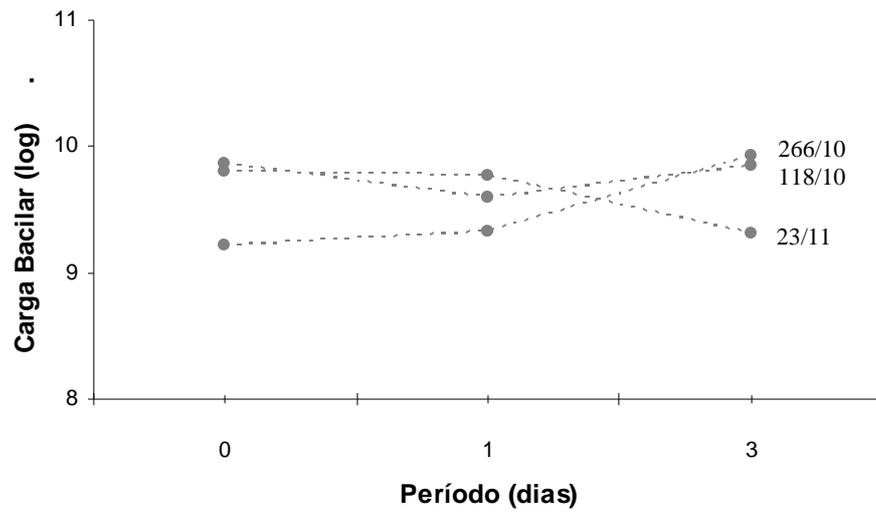


Figura 15. Quantificação da carga bacilar (log) de 3 pacientes acompanhados durante 30 dias de tratamento específico.

6 DISCUSSÃO

Apesar dos recentes avanços no diagnóstico laboratorial da doença nos países da Europa, América do Norte e Japão, a baciloscopia permanece como a ferramenta principal na detecção e acompanhamento dos casos de tuberculose pulmonar. Porém, a baixa sensibilidade apresentada pela técnica, pode acarretar um resultado falso-negativo causando danos tanto ao indivíduo quanto a sociedade (VIEIRA et al., 2008). O método diagnóstico considerado padrão-ouro para confirmação bacteriológica da tuberculose é a cultura. No entanto, a demora na obtenção dos resultados pelo lento crescimento do *M. tuberculosis* resulta geralmente em um diagnóstico tardio, favorecendo a transmissão, propagação e severidade da doença (FERREIRA et al., 2005)

O desenvolvimento de novos testes diagnósticos faz parte do novo plano mundial de controle da tuberculose para o período 2006-2015 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006). Parcerias público privadas como a “*Foundation for Innovative New Diagnostics*” (FIND) foram criadas para integrar pesquisas e o desenvolvimento de testes, direcionando-os para a necessidade do paciente e condições locais de infra-estrutura de saúde.

Como suporte aos métodos tradicionais, nos últimos anos, diversos artigos foram publicados baseados na amplificação do DNA de *M. tuberculosis* através da PCR e os resultados promissores obtidos, sugeriram ser esta técnica uma ferramenta muito útil na detecção molecular desse patógeno, especialmente na definição de casos inconclusivos através de dados clínicos e laboratoriais (BABA et al., 2008; LIMA et al., 2009; MILLER et al., 2002; PORTILLO-GÓMEZ; MORRIS; PANDURO, 2000; VAN COPPENRAET et al., 2004). Por outro lado, a detecção do DNA através da PCR pode permanecer positiva por mais de 12 meses após o diagnóstico e o início do tratamento específico, inclusive mantendo-se positivo mesmo após 6 meses da negativação da baciloscopia e cultura. Desta forma, a técnica de PCR convencional não deve ser utilizada para a detecção da viabilidade do bacilo após início de drogas tuberculostáticas, nem para o acompanhamento da resposta do paciente a terapêutica específica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004).

Na tentativa de superar as limitações encontradas com os métodos tradicionais e as dificuldades de abordagens baseadas em sistemas de PCR atualmente disponíveis, neste estudo, pode ser demonstrado que a PCR em tempo real é uma alternativa viável para a detecção e monitoramento da resposta terapêutica, através da detecção do RNA mensageiro que codifica o gene 85B do *M. tuberculosis*, em pacientes com TB pulmonar.

No estudo não foi realizado teste de especificidade dos *primers*, visto que, o autor que os desenhou (DESJARDIN et al., 1996) já havia realizado inicialmente esses testes com o DNA humano e genoma de outras micobactérias ou seja não houve amplificação característica do fragmento de 130pb (referente ao alvo 85B do Mtb) no DNA humano e nem no DNA extraído de outras micobactérias atípicas.

Analisando a curva padrão em relação a eficiência (ϵ), coeficiente de correlação (R^2) e slope confirmam o bom desempenho do sistema para a detecção do alvo 85B do *Mycobacterium tuberculosis* como demonstrado também nos estudos de Li et al., 2010; Mdivani et al., 2009; Desjardin et al., 1999 e Hellyer et al., 1999.

Em relação à população do estudo o sexo masculino foi o mais freqüente, o que condiz com a literatura (BRASIL, 2011; CAVALCANTI et al., 2006; SILVA; MONTEIRO; FIGUEIREDO, 2011). A faixa etária escolhida para o estudo foi de pacientes ≥ 15 anos, uma vez que esse grupo é responsável por 90% das formas pulmonares da tuberculose (BRASIL, 2002). Os dados referentes à idade acompanham o padrão nacional com faixa etária entre 17 a 78 anos, com média de 40 anos. Estudo mostra que nos últimos 20 anos houve uma elevação da incidência da tuberculose nas faixas etárias de 39-49 anos e de mais de 60 anos, fazendo com que a mediana de idade esteja em torno de 41 anos, portanto, com predomínio de um grupo economicamente ativo (VENDRAMINI et al. 2005).

A maioria da população estudada (73.47%) foi proveniente do ambulatório da Unidade de Saúde Joaquim Cavalcanti, o qual realiza busca ativa de sintomáticos respiratórios. Provavelmente, esse número elevado se deve ao compromisso com a população, numa atitude permanente e incorporada à rotina de atividades, de todos os membros das equipes de Saúde da Família do Brasil, de acordo com Plano Nacional de Controle da Tuberculose que visa à integração do Programa de Agentes Comunitários de Saúde e o Programa de Saúde da Família, para garantir a efetiva ampliação do acesso ao diagnóstico e tratamento (HIJAR et al., 2007).

Para o diagnóstico laboratorial dos pacientes sintomáticos respiratórios que procuram os serviços de saúde com tosse e expectoração há mais de duas semanas e que constituem casos suspeitos de tuberculose, é importante a realização da baciloscopia visando detectar casos de tuberculose pulmonar. Porém, calcula-se que no Brasil só 55,07% dos casos diagnosticados de TB cursam com baciloscopia positiva de escarro. Assim, se este fosse o único método empregado, metade dos casos não seria diagnosticada (BRASIL, 2008).

6.1 Avaliação do desempenho para a detecção do *M. tuberculosis* através da baciloscopia, cultura e RT-qPCR no total de pacientes com suspeita de TB pulmonar

Por apresentar uma baixa sensibilidade, a baciloscopia demonstrou uma positividade menor para detectar casos de TB pulmonar, em relação aos exames analisados. No entanto, a RT-qPCR apresentou uma capacidade de detecção semelhante à cultura, com a vantagem do resultado da PCR poder ser obtido em 24 a 48 horas e da cultura entre 2 até 8 semanas (NEGI et al., 2007).

O sistema de PCR em tempo real e suas variantes utilizadas na detecção do alvo 85B do RNA mensageiro apresentam variações de sensibilidade e especificidade dependentes de vários fatores, tais como: método de extração de RNA, qualidade do RNA obtido, oligonucleotídeos escolhidos, padrão-ouro utilizado, tipo de pacientes analisados (crianças, portadores de HIV, idosos, adultos imunocompetentes), forma de TB (pulmonar ou extrapulmonar), variação da PCR em Tempo Real (Multiplex-PCR, quantificação de RNA utilizando a reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) em uma ou duas etapas, eliminação das RNases, entre outros.

Dos 98 pacientes suspeitos de TB selecionados para a pesquisa considerando como padrão ouro a confirmação diagnóstica através da positividade da cultura associada a um conjunto de critérios clínicos e epidemiológicos e/ou resposta ao tratamento específico a baciloscopia apresentou uma especificidade de 100%, demonstrando alta capacidade de exclusão da doença, porém apresenta baixa capacidade de detecção da tuberculose com sensibilidade de 85,7%.

A RT-qPCR apresentou sensibilidade de 91,1% e especificidade de 97,6%. Os resultados obtidos neste estudo estão dentro dos padrões da literatura, apesar de escassa, cuja sensibilidade através da PCR em tempo Real e suas variantes na detecção do RNA mensageiro variam de 83 a 98% e especificidade de 72 a 100% em amostras clínicas de pacientes com TB pulmonar (HELLYER et al., 1999; NEGI et al., 2007; MDIVANI et al., 2009).

Provavelmente, sistemas baseados em PCR, como a RT-qPCR poderão servir como uma ferramenta importante para o diagnóstico precoce da TB pulmonar, sobretudo os que utilizam o DNA e demonstraram, em vários trabalhos, um bom desempenho na detecção do *M. tuberculosis* em amostras clínicas (BROCCOLO et al., 2003; SHRESTHA et al., 2003).

6.2 Avaliação da cultura e RT-qPCR como marcadores de viabilidade bacilar e no monitoramento da resposta a terapêutica específica nos 56 pacientes com tuberculose pulmonar

Como a baciloscopia não é recomendada para avaliar a viabilidade do bacilo, sendo indicada para a detecção da doença (BENTO et al., 2011), neste estudo, não foi analisada em relação ao monitoramento dos pacientes com TB pulmonar em tratamento.

A cultura é o método tradicionalmente utilizado para o monitoramento da viabilidade dos bacilos e susceptibilidade à terapêutica anti-TB (TAKAHASHI; TAMURA; ASAMI, 2008). Apesar do referido exame se manter como padrão ouro no diagnóstico e seguimento das infecções micobacterianas é, porém, um processo muito demorado, visto que, o *Mycobacterium tuberculosis* cresce lentamente requerendo várias semanas ou meses para sua detecção em amostras clínicas. A conversão da cultura de escarro positiva para negativa está relacionada com a atividade de esterilização, ou seja, morte dos bacilos nos tecidos, sendo considerado o melhor preditor de sucesso do tratamento específico (DESJARDIN et al., 1999). A terapêutica eficaz leva ao decréscimo do número de bacilos viáveis no escarro e reduz para cerca de 10 vezes dentro de 1 a 2 semanas (LI et al., 2009; MDIVANI et al., 2009).

Foi demonstrado neste estudo, uma excelente concordância entre a cultura e RT-qPCR em relação à resposta dos pacientes a terapia anti-TB, tendo sido observado através de um declínio de bacilos viáveis através da redução da carga bacilífera nos 56 pacientes com diagnóstico confirmado depois de iniciada a terapêutica. Estes achados concordam com os de Jou et al., (1997), Hellyer et al., (1999), Desjardin et al., (1997) e Mdivani et al., (2009). Desta forma, o método RT-qPCR pode ser considerado como um bom marcador de cura em pacientes com TB pulmonar.

Desjardin e outros (1999) analisaram os níveis de DNA, RNAm e rRNA, em dezenove pacientes durante o tratamento anti-TB, em relação a cultura e baciloscopia. Demonstraram que, houve um rápido declínio em 99% dos pacientes, no segundo mês de tratamento, nos níveis de 85B do RNA mensageiro como na positividade da cultura. Os autores concluíram que o desaparecimento ou a diminuição do RNAm do Mtb no escarro poderá ser usado como um bom indicador da viabilidade microbiana e um marcador útil para o monitoramento da resposta a terapêutica específica. A semelhança dos resultados com do nosso estudo, demonstra que o teste analisado (RT-qPCR) segue o marcador de cura tradicional (cultura) com a vantagem de ser mais rápido e poder ser usado no manuseio clínico e terapêutico dos

pacientes com TB pulmonar. Estudos semelhantes realizados pelos autores Jou et al (1997), Mdivani et al, (2009), Li et al., (2010), corroboram também com estes resultados.

Hellyer et al (1999) em estudo posterior comparou os níveis de 85B (RNAm), IS6110 (DNA), e 16S ribossomal RNA (rRNA) em culturas de *Mycobacterium tuberculosis* tratadas com Isonizida e Rifampicina. Os autores constataram que a exposição de cepas sensíveis a Isonizida e Rifampicina reduziu em 24hs os níveis de RNAm 85B. O rápido desaparecimento da expressão do RNA mensageiro em amostras de escarro de pacientes submetidos ao tratamento de primeira linha Isoniazida e Rifampicina na fase intensiva dos 2 primeiros meses, possivelmente se deve a ação bactericida das drogas bloqueando a síntese dos ácidos micólicos e impedindo a síntese de RNA mensageiro e de proteína pelo bacilo causando morte celular (HELLYER et al., 1999; LI et al., 2009; ARBEX et al., 2010). Por sua vez os níveis de IS6110 (DNA), e 16S ribossomal RNA (rRNA) não diminuíram no mesmo período. Concluíram assim, que a análise quantitativa do RNA mensageiro pode ser uma ferramenta útil para avaliar a rápida determinação da susceptibilidade do *M. tuberculosis* às drogas, bem como o monitoramento da eficácia terapêutica.

6.3 Quantificação do alvo 85B na RT-qPCR

A quantificação do alvo 85B do RNAm através do sistema RT-qPCR demonstrou a real queda da carga bacilífera durante o tratamento específico da tuberculose pulmonar nos 56 pacientes estudados, semelhante aos resultados encontrados por Desjardin et al., 1999; Mdivani et al., 2009; Hellyer et al., 1999.

Wallis e Johnson (2005), em estudo analisando o papel dos marcadores na avaliação clínica do tratamento da tuberculose apontou que a vantagem potencial do complexo antigênico 85B como marcador na detecção dos doentes com TB é que a resposta terapêutica é evidenciada precocemente (nos primeiros 3-14 dias de tratamento).

Devido a existência da presença do bacilo ter sido detectada em 3 pacientes no trigésimo dia de terapêutica apenas pelo RT-qPCR, provavelmente houve um resultado falso-negativo detectado pela cultura, visto que, o paciente em questão só apresentou melhora clínica evidente após o segundo mês de tratamento. Embora tenha havido uma redução da carga bacilífera no 30º dia pós-tratamento, com o resultado positivo da RT-qPCR, o referido paciente pode ser considerado ainda infectante. Desta forma, o período de transmissibilidade após o início da terapêutica anti-TB pode ser mantido mesmo em pacientes tratados corretamente, sem história de tratamento anterior nem outros riscos conhecidos de resistência.

Pesquisas, com uma maior casuística, são necessárias para demonstrar a utilidade da RT-qPCR como um indicador do período de transmissão da doença, além de ser uma ferramenta importante para o monitoramento clínico e terapêutico do paciente com TB pulmonar.

7 CONCLUSÕES

1. O rápido declínio, observado neste estudo, da carga bacilífera durante os 30 dias de acompanhamento do tratamento específico em pacientes com TB pulmonar, em concordância com o método de cultura, sugere que o RNA mensageiro 85B é um bom marcador de cura da doença.

2. A presença continuada de *M. tuberculosis* viável após início das drogas tuberculostáticas, detectada através da cultura e da manutenção da positividade da RT-qPCR analisando o antígeno 85, sugere que este sistema de PCR poderá ser útil também como sinalizador de resistência bacteriana.

3. O método RT-qPCR, como demonstrado neste estudo, sugere que além de poder ser utilizado como um bom marcador de cura e de viabilidade bacilar pode também ser útil como um indicador do período de transmissibilidade do paciente com TB pulmonar em vigência de tratamento específico.

4. Pesquisas futuras de validação deverão ser realizadas com pacientes em tratamento com TB pulmonar, para melhor demonstrar a real utilidade da RT-qPCR analisando o antígeno 85B, no monitoramento clínico e terapêutico da doença, como sinalizador de resistência bacteriana e indicador do período de transmissão do *M. tuberculosis* de pacientes em tratamento para TB pulmonar.

REFERÊNCIAS

- AELLEN, S. et al. Detection of live and antibiotic-killed bacteria by quantitative real-time PCR of specific fragments of rRNA. Antimicrob Agents Chemother, Washington, v.50, p.1913–20, 2006.
- AFGHANI, B. et al. Comparison of quantitative polymerase chain reaction, acid fast bacilli smear, and culture results in patients receiving therapy for pulmonary tuberculosis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, New York, v.29, p.73-79, 1997.
- ALBUQUERQUE, M. F. M. et al. Prognostic factors for pulmonary tuberculosis outcome in Recife, Pernambuco, Brazil. Revista Panamericana de Salud Pública, Washington, v. 9, n.6, p. 368-374, 2001.
- ALDOUS, W. K. et al. Comparison of Six Methods of Extracting Mycobacterium tuberculosis DNA from Processed Sputum for Testing by Quantitative Real-Time PCR. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v.43, n.5, p.2471-2473, 2005.
- ALMEDA, J. et al. Clinical evaluation of an in-house IS6110 polymerase reaction for diagnosis of tuberculosis. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Berlin, v.19, n.11, p. 859-867, 2000.
- AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in adults and children. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, New York, v. 161, p.1376-1395, 2000.
- API Consensus Expert Committee. API TB Consensus Guidelines 2006: Management of pulmonary tuberculosis, extra-pulmonary tuberculosis and tuberculosis in special situations. Journal of the Association of Physicians of India, Mumbai, v. 54, p.219-234, 2006.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Real Time PCR Systems: Absolute Quantification Getting Started Guide. Atlanta, 2005. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com/realtimereguide>>. Acesso em: 10 jan 2008.
- APPLIED BIOSYSTEMS. 7500/7500 Fast Real-Time PCR System: Standard Curve Experiments Getting Started Guide. Califórnia, 2007. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_050329.pdf> Acesso em: 10 jan de 2011
- ARBEX, M. A. et al. Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 1: Fármacos de primeira linha. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, v. 36, n. 5, p.626-640, 2010.
- ARMITIGE, L.Y. et al. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of Mycobacterium tuberculosis H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. Infection and Immunity, Washington, v. 68, n.2, p.767-778, Feb. 2000.
- ARNOLD, C. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Clinical Microbiology and Infection, Oxford, v.13, p. 120–128, 2007.

ARAÚJO, F. A. A. et al. Associated factors to pulmonary tuberculosis and sputum smear results in Natal/RN. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v.8, n.2, p. 142-149, 2005.

BABA, K. et al. Real-time Quantitative PCR in the Diagnosis of Tuberculosis in Formalin-fixed Paraffin-embedded Pleural Tissue in Patients From a High HIV Endemic Area. Diagnostic Molecular Pathology, New York, v.17, n.2, p.112-117, 2008.

BARRETO, A. M. W.; CAMPOS, C. E .D.; MARTINS, F. M. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 1994.

BARRETO, M. L. et al. Sucessos e fracassos no controle de doenças infecciosas no Brasil: o contexto social e ambiental, políticas, intervenções e necessidades de pesquisa. Saúde no Brasil 3. Disponível em:
< <http://download.thelancet.com/flatcontentassets/pdfs/brazil/brazilpor3.pdf> >
Acesso em: 06 jun 2011

BASTOS, B. Tuberculose: PE é 3º em número de casos. Folha de Pernambuco, Recife, 25 mar 2010. Disponível em: <<http://www.folhape.com.br/index.php/caderno-grande-recife/557870?task=view>>. Acesso em : 30 abr 2010.

BEHR, M. A.; WARREN, S. A. et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. Lancet, London, v. 353, n.9151, p.444-449, 1999.

BENTLEY-HIBBERT, S. I. et al. Pathophysiology of antigen 85 in patients with active tuberculosis: antigen 85 circulates as complexes with fibronectin and immunoglobulin G. Infection and Immunity , v.67, p.581–588, 1999.

BENTO, J. et al. Métodos diagnósticos em tuberculose. Acta Medica Portuguesa, Portugal, v. 24, n.1, p. 145-154, jul 2011

BLOOM B.R.; MURRAY C.J.L. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. Science, Washington, v.257, p. 1055-1064, 1992.

BOLLELA, V.R.; SATO, D.N.; FONSECA, B.A.L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose infantil. Revista Saúde Pública, v. 3, n.3, p. 281-286, 1999.

BRAGA, E.C. et al. Tuberculosis, reemerging pathology: Incidence and associated factors. Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica, São Paulo, v.2, n.1, p.1-5. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 2002.

BIÉCHE, I. et al. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. International Journal of Cancer, New York, v.78, p. 661–666, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5 ed. Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Incidência de tuberculose cai 27,58% em 10 anos.

Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=10504>. Acesso em: 31 ago 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Indicadores de Morbidade e Fatores de Risco: Taxa de Incidência de Tuberculose. Rio de Janeiro, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual Nacional de Vigilância em Saúde e outras Micobactérias. 1. ed. Brasília, DF, 2008. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb.pdf>. Acesso em: 20 jun 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica Tuberculose. 7. ed. Brasília, DF, 2010 Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_tuberculose.pdf> Acesso em: 05 maio 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_versao_28_de_agosto_v_5.pdf> Acesso em: 20 mar 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica: Taxa de Incidência. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa_incidencia_tb_1990_2010_atual_31_05_11.pdf> Acesso em: 25 jul 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de controle da tuberculose: Situação da Tuberculose no Brasil e no Mundo. Rio de Janeiro, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose. 2. ed. rev. Brasília, 2008. (Série A. Normas e Manuais Técnicos); (Cadernos de Atenção Básica, n. 21).

BRASIL. Ministério da Saúde. Tuberculose. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21445>. Acesso em: 04 jan 2007.

BROCCOLO, F. et al. Rapid Diagnosis of Mycobacterial Infections and Quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* Load by Two Real-Time Calibrated PCR Assays. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 41, n. 10, p. 4565-4572, 2003.

BURGRAFF, S. et al. Comparison of an internally controlled, large-volume LightCycler assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples with the COBAS

AMPLICOR assay. Journal Clinical Microbiology, Washington, v.43, n.4, p.1564-1569, 2005.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, New York, v. 25, p.169–193, 2000.

BUSTIN, S. A.; DORUDI, S. Molecular assessment of tumour stage and disease recurrence using PCR-based assays. Molecular Medicine Today, Cambridge, v.4, p. 389–396. 1998.

CALIARI, S. J; FIGUEIREDO, M. R. Perfil dos pacientes com tuberculose internados em hospital especializado no Brasil. Revista Panamericana de Infectologia, São Paulo, v.9, n.4, p. 34-35. 2007.

CAMPOS, H. M. A. et al. O retratamento da tuberculose no município do Recife, 1997: uma abordagem epidemiológica. Jornal de Pneumologia, Brasília, v. 26, p.5, 2000.

CANETTI, G. et al. Mycobacteria; laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bulletin - World Health Organization, Geneva, v.29, p.565-578, 1963.

CARVALHO, F.C.Q. Modelos Preditivos para o diagnóstico da Tuberculose Pulmonar Paucibacilar. 2001. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

CASTELO FILHO, A. et al. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. Jornal Brasileiro Pneumologia, Brasília, v.30, n.1, p. S57-S86, 2004.

CAVALCANTI, Z. R. et al. Características da tuberculose em idosos no Recife (PE): contribuição para o programa de controle Jornal Brasileiro Pneumologia, Brasília, v.32, n.6, p. 535-543, 2006

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification test in the diagnosis of tuberculosis. Morbidity and Mortality Weekly Report, v.58, n.01, 7-10, 2009. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5801a3.htm>> Acesso em: 20 maio 2010.

CHENG, V. C. C.; YEW, W. W.; YUEN, K. Y. Molecular diagnostics in tuberculosis. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, v. 24 n. 11, p. 711-720, 2005

CHIANG, C.Y. et al. A survey of TB services in hospitals in seven large cities in Asia and North Africa. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, v.11, n.7, p.739-46, 2007.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acidguanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry, London, v.162, n.1, p.156-159, 1987.

COMISSÃO de Tuberculose da Sociedade Brasileira Pneumologia e Tisiologia. Grupo de Trabalho das Diretrizes para Tuberculose da SBPT. III Diretrizes para Tuberculose da

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, v. 35, n. 10, p. 1018-1048, 2009.

COBERLY, J.S.; CHAISSON, R.E. Tuberculosis. In: NELSON, K.E; WILLIAMS, C.M; GRAHAM N.M.H. (Ed.) Infectious Disease Epidemiology: Theory and Practice. Aspen: Marylan, 2011. p 411-437.

CONDE, M. B.; SOUZA, G. M.; KRITSKI, A. L. Tuberculose sem medo. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

DALCOLMO, M.P. et al. Estudo de efetividade de esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente no Brasil. Jornal de Pneumologia, v. 25, p.63-69, 1999.

DERVEAUX, S.; VANDERSOMPELE, J. O.; HELLEMANS, J. A. N. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. Methods, San Diego, v. 50, p. 227 – 230, 2010.

DESJARDIN, L. E. et al. Measurement of Sputum *Mycobacterium tuberculosis* mRNA as a Surrogate for Response to Chemotherapy. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, New York, v. 160, n. 1, p. 203-210, 1999.

DESJARDIN, L. E. et al. Alkaline decontamination of sputum specimens adversely affects stability of mycobacterial mRNA. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 34, n.10, p. 2435–2439, 1996.

DINIZ, L. S. et al. Efetividade do tratamento da tuberculose em oito municípios e capitais brasileiras. Boletim Pneumologia Sanitária, Rio de Janeiro, v. 3, n.1, p.6–18, 1995.

DUARTE, C. A. B. Detecção e quantificação do vírus da hepatite C através de RT-PCR em Tempo-Real, 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

DUCATI, R. G. et al. The resumption of consumption: a review on tuberculosis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.

EISENACH, K. D. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. American Review of Respiratory Disease, New York, v.144, p. 1160–1163, 1991.

ESPINAL, M. A. The global situation of MDR-TB. Tuberculosis, v.83, p.44-51, 2003.

ESPY, M. J. et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clinical Microbiology Reviews, New York, v. 19, 165–256, 2006.

FÄTKENHEUER, G. et al. The return of tuberculosis, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, New York, v. 34, p. 139-146, 1999.

FERREIRA, A. A. A. et al. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. Revista Brasileira Epidemiologia, São Paulo, v.8, n.2, p 142-149, 2005.

FLORES, L.L. et al. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. BMC Microbiology, v.5, p.55, 2005.

FRAGA, D.; MEULIA, T.; FENSTER, S. Real-Time PCR, Current Protocols Essential Laboratory Techniques. 3 ed, Baltimore: John Wiley & Sons, 2008.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 137, p. 214-221, 2006.

GANDY, M.; ZUMLA, A. The resurgence of disease: social and historical perspectives on the new tuberculosis. Social Science and Medicine, Oxford, v.55, p.385-396, 2002.

GANGULY, N.K. et al. What is new in the diagnosis of tuberculosis? Part I: techniques for diagnosis of tuberculosis. ICMR Bulletin, New Delhi, v.32, p.8, 2002.

GLAZIOU, P. et al. Global Burden and Epidemiology of Tuberculosis. Clinics in Chest Medicine, Philadelphia, v. 30, 621–636, 2009.

GOBLE, M. et al. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. The New England Journal of Medicine, Boston, v.328, n.8, p.527-532, 1993.

GOMES, A. L. V., et al. Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of *Schistosoma mansoni* DNA. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.101, n.1, p. 133-136, 2006.

GOMES, A. L. V. Desenvolvimento e validação da detecção molecular da infecção por *Schistosoma mansoni* em lotes de moluscos vetores para identificação de focos de transmissão. 2008. Tese (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

GOMES, A. L. V. Expressão de genes relacionados com a indução da resposta imune inata da dengue: implicações no prognóstico. 2011. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

GOSSEIN, R. A; ROSAI, J. Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells. Cancer, Philadelphia, v. 78, n.1, p.10-16, 1996.

GREEN, C. et al. Rapid diagnosis of tuberculosis through the detection of mycobacterial DNA in urine by nucleic acid amplification methods. Lancet Infectious Diseases, New York, v.9, n.8, p.505-511, 2009.

GUERRA, R L.; REGO, L.; CONDE, M. B. Diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes com baciloscopia direta de escarro negativa. Pulmão, Rio de Janeiro, v.17, n. 2-4, p.87-90, 2008.

HARRIS, A. D.; MAHER, D.; GRAHAM, S. Manual clínico TB/HIV. 2. ed. Geneva: Organização Mundial da Saúde, 2004.

HARTH, G. et al. Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity, Washington, v.64, p.3038–3047, 1996.

HELLYER, T. J. et al. Strand displacement amplification and the polymerase chain reaction for monitoring response to treatment in patients with pulmonary tuberculosis. Journal of Infectious Diseases, Chicago, v.173, p.934–941, 1996.

HELLYER, T. J. et al. Quantitative Analysis of mRNA as a Marker for Viability of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal Clinical Microbiology, Washington, v. 37, n.2, p. 290–295, 1999.

HELLYER, T. J. et al. Detection of viable *Mycobacterium tuberculosis* by reverse transcriptase-strand displacement amplification of mRNA. Journal Clinical Microbiology, Washington, v.37, n.3, p.518-523, 1999.

HIJJAR, M. A. et al. Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. Revista Saúde Pública, São Paulo, v.41, n.1, p. 50-58, 2007.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology, New York, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HILLEMANN D., et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains by real-time PCR. Journal Clinical Microbiology, Washington, v. 44, p.302-306, 2006.

HU, Y. et al. Detection of mRNA transcripts and active transcription in persistent *Mycobacterium tuberculosis* induced by exposure to rifampin or pyrazinamide. Journal of Bacteriology, Washington, v.182, p.6358–6365, 2000.

INVITROGEN. TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing. Carlsbad, 2006. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topotaseq_man.pdf>. Acesso em: 15 dez 2009.

INVITROGEN. SuperScript III Reverse Transcriptase, Carlsbad, 2007. Disponível em: http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/data/Product_manuals_attach/superscript2.pdf. Acesso em: 12dez 2008.

INVITROGEN. TRIZOL® LS REAGENT, Carlsbad, 2008. Disponível em: <<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/10296028>>. Acesso em: 20 jan 2008.

IOVANNISCI, D. M.; WINN-DEEN, E. S. Ligation amplification and fluorescence detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA. Molecular and Cellular Biochemistry, The Hague, v.7, p.35–43, 1993.

JAMAL, L. F.; MOHERDAUI, F. Tuberculose e Infecção pelo HIV no Brasil: magnitude do problema e estratégias para o controle. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 41, p. 104-110, 2007.

JENSEN, P.A et al. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings, 2005. MMWR Recommendations and Reports, v. 54, p. 1–141, 2005.

JONAS, V. et al. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 31, p.2410–2416, 1993.

JOU, N. T. et al. Single-Tube, Nested, Reverse Transcriptase PCR for Detection of Viable *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 35, n. 5, p. 1161–1165, 1997.

KHAN, M.A, et al. Peripheral Blood-Based Polymerase Chain Reaction in Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. Journal of Ayub Medical College, Abbottabad , v. 18, n. 2, p. 25-28, 2006.

KATOCH, V.M. Advances in Molecular Diagnosis of Tuberculosis. Medical Journal Armed Forces Índia, Philadelphia, v. 59, n.3, p. 182-186, 2003.

KENT, P. T.; KUBICA, G. P. Public Health Mycobacteriology: a Guide for the Level III Laboratory. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, 1985.

KINDICH, R. et al. Application of a modified real-time PCR technique for relative gene copy number quantification to the determination of the relationship between NKX3.1 loss and MYC gain in prostate cancer. Clinical Chemistry, New York, v.51, n.3, p.649-652, 2005.

KIVIHYA-NDUGGA, L. et al. Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. Journal Clinical Microbiology, Washington, v. 42, n.3, p.1012-5, 2004

KOBAYASHI, N. et al. The use of Real Time Polymerase Chain Reaction for rapid diagnosis of skeletal tuberculosis. Archive of Pathology and Laboratory Medicine, Chicago, v.130, p. 1053-1056, 2006.

KONEMAN, E.W et al. Diagnostic microbiology. In: Koneman EW, Allen SD. Mycobacteria, Philadelphia: J.B. Lippincott Company, p. 703-55, 1992.

KÖNIGSHOFF, M. et al. HER-2/neu gene copy number quantified by real-time PCR: comparison of gene amplification, heterozygosity, and immunohistochemical status in breast cancer tissue. Clinical Chemistry, New York, v. 49, n.2, p.219-229, 2003.

KRITSKI, A. L.; CONDE, M.B.; SOUZA, G.R.M. In: _____. Tuberculose: do Ambulatório à Enfermaria, 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.Cap. 1.

KURABACHEW, M.; ENGER, O.; SANDAA, R et al. A multiplex polymerase chain reaction assay for genus, group, and species-specific detection of mycobacteria. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, New York, v.49, p.99-104, 2004.

KUBISTA, M. et al. The real Time polymerase chain reaction. Molecular aspects of Medicine, London, v. 27, p. 95-125, 2005.

LEE, B.Y.; HORWITZ, M. A. Identification of macrophage and stress-induced proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Investigation, New York, v.96, p. 245– 249, 1995.

LEMAÎTRE, N. et al. Comparison of the real-time PCR method and the Gen-Probe amplified Mycobacterium tuberculosis direct test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and nonpulmonary specimens. Journal Clinical Microbiology, Washington, v. 42, p.4307–4309, 2004.

LI, L. et al. Sputum Mycobacterium tuberculosis as a marker of bacteriologic clearance in response to anti-tuberculosis therapy. Journal Clinical Microbiology, Washington, v. 48, n.1, p.46-51, 2010.

LIEGMANN, K.; PETER, J. B. Rapid Detection of Smear-Negative *Mycobacterium tuberculosis* by PCR and Sequencing for Rifampin Resistance with DNA Extracted Directly from Slides. Journal Clinical Microbiology, Washington, v.39, n.1, p.51-2, 2001.

LIMA, J. F. C. et al. Desempenho da técnica *nested* PCR na detecção específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, v.35, n.7, p. 690-697, 2009.

LOPES, A. J. et al. Características da tuberculose em adolescentes: uma contribuição para o programa de controle. Revista Brasileira de Pneumologia Sanitária, Rio de Janeiro, v.4, n4, p.21-28, 2007.

MARTÍNEZ, A. N. Detecção de *Mycobacterium leprae* através da técnica de PCR e RT-PCR em tempo real. 2009. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular); Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009

MARTÍNEZ, A. N. et al. Molecular Determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of Real-Time PCR. Journal of Clinical Microbiology, v. 47, p. 2124-2130, 2009.

MELLO, L.C.Q. Modelos preditivos para o diagnóstico da tuberculose pulmonar paucibacilar. Tese (Doutorado em Clínica Médica); Faculdade de Medicina da UFRJ, Rio de Janeiro, 2001.

MELLO, F.C; FONSECA-COSTA, J. The utility of molecular biology in the diagnosis of tuberculosis. Journal Brasileiro Pneumologia, Brasília, v. 31, n.3, p.188-190, 2005.

MENEZES, A. Secretaria do Estado de Pernambuco. Projeto Sanar - Doenças Negligenciadas. Disponível em: <<http://portal.saude.pe.gov.br/programas-e-acoas/controlado-doencas/projeto-sanar-doencas-negligenciadas>> Acesso em: 02 jun 2011.

- MDIVANI, N. et al. Monitoring Therapeutic Efficacy by Real-Time Detection of *Mycobacterium tuberculosis* mRNA in Sputum. Clinical Chemistry, New York, v.55, n.9, p.1694–1700, 2009.
- MILLER, N. et al. Rapid and Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Acid-Fast Bacillus Smear-Positive Respiratory Specimens and BacT/ALERT MP Culture Bottles by Using Fluorogenic Probes and Real-Time PCR. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 40, n. 11, p. 4143-4147, 2002.
- MUDANÇAS no Tratamento da Tuberculose. Rev. Saúde Pública, São Paulo, v. 44, n. 1, Feb. 2010.
- NASCIMENTO, S; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica, São Paulo, v.67, p. 1-16, 2010.
- NEGI, S.S et al. Diagnostic potential of IS6110, 38kDa, 65kDa and 85B sequence-based polymerase chain reaction in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. Indian Journal of Medical Microbiology, Mumbai, v.25, p.43-9. 2007.
- NEVES, D. D. ; MORISSON, P. Novos métodos no diagnóstico da tuberculose pleural. Pulmão, Rio de Janeiro, v.16, p.1, p.32-38, 2007.
- NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nature Protocols, New York, v.1, p.1559 – 158, 2006.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. Revista Biotecnologia Ciência and Desenvolvimento, Brasília, v. 33, p. 10-13, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Núcleo.... Tuberculose. Clipping, Brasília, p.21-41, 25 mar 2010. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/clipping25032010.pdf>> Acesso em: 27 mar 2010.
- NOUSSAIR, L. et al. Early Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by a New Procedure Combining Broth Culture and PCR. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 47, n. 5, p. 1452–1457, 2009.
- OGUSKU, M. M.; SALEM, J. I. Análise de diferentes primers utilizados na PCR visando o diagnóstico da tuberculose no estado do Amazonas. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, v. 30, p. 433-439, 2004.
- OPLUSTIL, C. P. et al. Impacto da automação no diagnóstico de infecções por micobactérias. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro, v.38, n.3, p. 167-173, 2002.
- ORARA, N. et al. Analysis of the Genes Encoding the Antigen 85 Complex and MPT51 from *Mycobacterium avium*. Infection and Immunity, Washington, v. 65, n.9, p. 3680–3685, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_HTM_TB_2006.371_eng.pdf> Acesso em: 10 fev 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Tuberculosis Facts 2006. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/2006/tb_factsheet_2006_1_en.pdf>. Acesso em: 15 jan 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report> Acesso em: 15 fev de 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global tuberculosis control, surveillance, planning, financing: Report. Geneva, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007/pdf/full.pdf> Acesso em: 27 ago 2009

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Update Tuberculosis Facts 2009. Disponível em: <http://www.stoptb.org/assets/documents/resources/factsheets/tbfactsheet_2009update_one_page.pdf> Acesso em: 4 jun 2009.

PAIVA CAVALCANTI, M. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. Veterinary Journal, London, v. 182, n.2, p.356-8, 2009.

LIMA, S. S. S. et al. Métodos convencionais e moleculares para o diagnóstico da tuberculose pulmonar: um estudo comparativo. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, v.34, n.12, p. 1056-1062, 2008.

PAIVA CAVALCANTI, M.; LORENA, V. M. B.; GOMES, Y. M. Avanços biotecnológicos para o Diagnóstico das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Revista de Patologia Tropical, Goiania, v. 37, n.1, p. 1-14, 2008.

PALOMINO J.C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. European Respiratory Journal, Copenhagen, v. 26, p. 339, 2005.

PANDOLFI, J. R. et al. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, Araraquara, v. 28, n.3, p. 251-257, 2007.

PARASHAR, D.; CHAUHAN, D.S.; SHARMA, V.D., et al. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. Indian Journal of Medical Research, New Delhi, v. 124, p. 385-398, 2006

PATNAIK, M.; LIEGMANN, K.; PETER, J. B. Rapid Detection of Smear-Negative *Mycobacterium tuberculosis* by PCR and Sequencing for Rifampin Resistance with DNA Extracted Directly from Slides. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 39, n. 1, p. 51-52, 2001.

PERKINS, M. D. New diagnostic tools for tuberculosis. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, Paris, v. 4, n. 12, p. 182-8, 2000.

PLATONOW, V. Casos de tuberculose diminuem no Brasil, mas doença ainda contamina 70 mil por ano. Agência Brasil, Rio de Janeiro, 31 ago. 2009. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/noticia/2009-09-01/casos-de-tuberculose-diminuem-no-brasil-mas-doenca-ainda-contamina-70-mil-por-ano>>. Acesso em: 06 fev 2010.

POROCA, D. R., et al. Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex. Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical, Brasília, v.42, n.6, p. 716-722, 2009.

PORTILLO-GÓMEZ, L.; MORRIS, S. L.; PANDURO, A. Rapid and efficient detection of extrapulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, Paris, v. 4, n. 4, p.361-370, 2000.

POUNDER, J. I.; ALDOUS, W. K.; WOODS, G. L. Comparasion of real time polymerase chain reaction using the Smart Cycler and Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *M. tuberculosis* complex in clinical specimes. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, New York, v.54, p.217-222, 2006.

RAMACHANDRAN, C.; MELNICK, S. J. Multidrug Resistance in Human Tumors "C Molecular Diagnosis and Clinical Significance. Molecular Diagnosis, Naperville, v.4, p.81-94, 1999.

RIBEIRO, L. Medicina no Brasil Colonial. Rio de Janeiro: Sul Americana, 1971.

RODRIGUES, J. J. S. R., et al. Técnicas de Biologia Molecular aplicadas ao Diagnóstico. In: Rossetti, et al. Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 2, p.21-22, 2005.

RUFFINO-NETTO, A. Impacto da reforma do Setor Saúde sobre os serviços de tuberculose no Brasil. Boletim Pneumologia Sanitária, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 7-18, 1999.

RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 35, n.1, p.51-58, 2002.

RUFFINO-NETTO, A. Programa de controle da tuberculose no Brasil: situação atual e novas perspectivas. Informe Epidemiológico do SUS, Brasília, v.10, n.3, p. 129-138, 2002.

SARMIENTO, O.L.; WEIGLE, K.A.; ALEXANDER, J.; WEBER, D.J.; MILLER, W.C. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 41, p. 3233-3240, 2003.

SCATENA, L.M. et al. Dificuldades de acesso a serviços de saúde para o diagnóstico de tuberculose em municípios do Brasil. Revista Saúde Pública, São Paulo, v.43, n.3, p. 389-397, 2009.

SCHERER, L.C et al. Cost-effectiveness analysis of PCR for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. BioMed Central Infectious Diseases, London, v.9, p.216, 2009.

SCHERER, L. C. Avaliação da técnica de PCR *in house* no diagnóstico de Tuberculose Pulmonar. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Bioquímica)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SHRESTHA, N. K. et al. Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 41, n. 11, p. 5121-5126, 2003.

SILVA, A. T. P.; MONTEIRO, S. G.; FIGUEIREDO, P. M. S. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de tuberculose extrapulmonar atendidos em hospital da rede pública no estado do Maranhão. Revista Brasileira Clínica Médica, São Paulo, v.9, n.1, p. 11-4, 2011.

SINGH, S. Tuberculosis, focus on tropical diseases. Current Anaesthesia and Critical Care, Edinburgh, v.15, p.165-171, 2004.

TAKAHASHI, T.; NAKAYAMA, T. Novel Technique of Quantitative Nested Real-Time PCR Assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA. Journal Clinical Microbiology, Washington, p. 1029-1039, 2006.

THOMSEN, V. O. et al. Monitoring treatment of patients with pulmonary tuberculosis: can PCR be applied? Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 37, p.3601-3607, 1999.

TOO, H. P. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. Molecular Brain Research, Amsterdam, v.114, p.146-154, 2003.

TOIT, L.; DU C.; PILLAY V. Danckwerts, M. P. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches. Respiratory Research, London, v.7, p.118, 2006.

TORTOLI, E. The new mycobacteria: an update. FEMS Immunology and Medical Microbiology, Amsterdam, v.48, p.159-178, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. Microbiologia. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TUBERCULOSE. Boletim de Vigilância em Saúde, Recife, p.6-7, 2011.

TUBERCULOSE. API TB Consensus Guidelines 2006: Management of pulmonary tuberculosis, extra-pulmonary tuberculosis and tuberculosis in special situations. Journal of the Association Physicians India, Bombay, v.54, p. 219-234, 2006.

VANGUILDER, H. H.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. BioTechniques, London, v. 44, p. 619-626, 2008.

VAN COPPENRAET, E. S. B. et al. Real-time PCR assay using fine needle aspirates and tissue biopsy specimens for rapid diagnosis of mycobacterial lymphadenitis in children. Journal of Clinical Microbiology, v. 42, n.6, p. 2644-2650, 2004.

VENDRAMINI, S. H. F. et al. Tuberculose em município de porte médio do Sudeste do Brasil: indicadores de morbidade e mortalidade, de 1985 a 2003. Jornal Brasileiro Pneumologia, Brasília, v.31, n.3, p.237-43. 2005.

VIEIRA, F. D. et al. Metodologia para caracterização de proficiência em leitura de resultados baciloscópicos para o diagnóstico da tuberculose. Jornal Brasileiro Pneumologia, Brasília, v.34, n.5, p.304-311, 2008

WIKER, H. G.; HARBOE, M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiological Reviews, Washington, v.56, p.648-661, 1992.

WALKER, G. T., et al. Strand displacement amplification-an isothermal, *in vitro* DNA amplification technique. Nucleic Acids Research, London, v.20, p.1691-1696, 1992.

WALLIS, R. S.; JOHNSON, J. L. The Role of Surrogate Markers in the Clinical Evaluation of Antituberculous Chemotherapy. Current Medicinal Chemistry, Schiphol, v. 4, n.3, p.1-8, 2005.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR based diagnostics for infections diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. The Lancet, London, v. 4, p.337-348, 2004.

ZHANG, Y; POST-MARTENS, K.; DENKIN, S. New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. Drug Discovery Today, Oxford, v.11, n.1/2, p.21-27, 2006.

Apêndice A - Termo de Consentimento

			
Centro de Pesquisas AGGEU MAGALHÃES		Ministério da Saúde	

PACIENTE: _____	IDADE: _____
HOSPITAL: _____	Prontuário: _____
ENDEREÇO DO PACIENTE: _____	Nº: _____
BAIRRO: _____	CIDADE: _____
_____	ESTADO: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a), da pesquisa: "Avaliação da quantificação do RNA mensageiro (RNAm) do *Mycobacterium tuberculosis* por PCR em Tempo Real como marcador de cura de pacientes com tuberculose pulmonar", após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do Projeto: Avaliação da quantificação do RNA mensageiro (RNAm) do *Mycobacterium tuberculosis* por PCR em Tempo Real como marcador de cura de pacientes com tuberculose pulmonar.

Pesquisador (a) Responsável: Rosana de Albuquerque Montenegro
Telefones para contato: (81) 2101-2569
Pesquisadores Participantes: Lillian Maria Lapa Montenegro, Haiana Charifker Schindler.

Objetivos: O objetivo da nossa pesquisa é analisar a validade da PCR em tempo Real utilizando RNAm do *Mycobacterium tuberculosis*, em comparação com os métodos convencionais (baciloscopia e cultura), para o monitoramento do tratamento da tuberculose pulmonar.

Procedimentos do estudo: Quando o Sr(a) for atendido pelo médico(a) assistente do hospital, você responderá a um questionário onde irão constar: nome, endereço, telefone para contato, característica do domicílio, escolaridade, queixas principais e tempo de duração, se está tomando algum remédio, exames físico, laboratoriais e tratamento atual. O preenchimento do questionário será feito por um dos colaboradores da pesquisa.

O Sr(a) será acompanhado durante os seis meses de tratamento por uma equipe multidisciplinar envolvendo os médicos responsáveis pela Instituição com experiência reconhecida no manejo da tuberculose em adultos, enfermeiras e técnicos que coletarão outros exames necessários e seguirão os procedimentos adequados e de rotina do hospital para cada caso. O acompanhamento e tratamento serão feitos pelo médico assistente do serviço que, cujos pacientes estão sendo investigados quanto à existência ou não de Tuberculose. Caso for diagnosticada a doença será utilizado como terapia de primeira escolha o esquema com rifampicina, isoniazida e pirazinamida para o tratamento e se necessário, um esquema de segunda escolha será oferecido em casos selecionados. O Tratamento será fornecido pelo Posto de Saúde do Programa de Saúde da Família.

Para a nossa pesquisa coletaremos 2ml de escarro que serão encaminhadas ao Laboratório de Imunoepidemiologia do Departamento de Imunologia do CPqAM para ser submetida a técnica de cultura de *Mycobacterium* e de biologia molecular (qPCR) por profissionais capacitados. Os resultados de todos os exames serão encaminhados ao médico responsável pelo atendimento. As amostras serão congeladas e armazenadas para uso futuro caso seja necessário.

Riscos e Benefícios: O Sr (a) não será submetido a qualquer risco ou desconforto adicional e seguiremos a rotina estabelecida pelo profissional de saúde, seja a nível ambulatorial ou enfermaria. O benefício deste estudo será contribuir para o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, específicas, rápidas e menos dolorosas que possam ser adequadas à realidade do nosso Sistema Público de Saúde, e a padronização de critérios mais adequados de diagnóstico e tratamento que irão beneficiar um melhor tratamento e a cura mais precocemente da tuberculose pulmonar.

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n - Cx. Postal 7472 - Fone: 0XX81 21012500 - Fax: 0XX81 4531911 - CEP: 50670-420 Recife - PE - Brasil - <http://www.cpqam.fiocruz.br>



Centro de Pesquisas

AGGEU MAGALHÃES

FIOCRUZ

Ministério da Saúde

Custo/Reembolso para o paciente: Não haverá nenhum gasto com sua participação. As consultas, exames, tratamentos serão totalmente gratuitos, não recebendo nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

Serão guardadas no Laboratório de Imunoepidemiologia do CPqAM as amostras dos líquidos coletados para que possamos repetir o exame de PCR, caso seja necessário. O Sr (a) poderá entrar em contato com o responsável pela amostra no endereço abaixo:

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia
Avenida Moraes Rego, s/n°, Cidade Universitária.
Campus da UFPE.
Fone: (81) 2101-2569

Contato: Rosana de Albuquerque Montenegro, Lílian Maria Lapa Montenegro, Haiana Charifker Schindler.

CONSENTIMENTO

Eu,

_____, RG/CPF _____ declaro que entendi os objetivos da pesquisa e sem ter sido pressionado ou constrangido concordo participar da pesquisa. Tenho consciência do meu direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento e de que as informações colhidas serão mantidas em sigilo. Os resultados da pesquisa podem ser apresentados em congressos ou publicados em revistas de cunho técnico, sem que seja divulgado o nome do paciente.

Nome do Paciente: _____

Assinatura do paciente ou do responsável

Assinatura do médico/pesquisador

_____, ____/____/____.

Apêndice B – Protocolo de Pesquisa de Tuberculose

PROTOCOLO DE PESQUISA DE TUBERCULOSE			
IDENTIFICAÇÃO			
1. Número da ficha na pesquisa <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	2. Data da entre vista ____ / ____ / ____	3. Procedência: 1. Ambulatório 2. Enfermaria <input type="checkbox"/>	4. Hospital de origem: <input type="checkbox"/> 1. Hospital das Clínicas 2. Hospital Otávio de Freitas 3. IMIP 4. Hospital Barão de Lucena 5. Outro: _____
DADOS DO PACIENTE			
7. Nome Completo do Paciente _____			
9. Data de nascimento ____ / ____ / ____	10. Idade do paciente <input type="text"/> anos <input type="text"/> meses	11. Sexo 1. Feminino <input type="checkbox"/> 2. Masculino	
12. Endereço _____ Ponto de referência _____		13. CEP _____	14. Telefone Res. e Celular (____) _____ - _____ (____) _____ - _____
15. Bairro _____	16. Cidade _____	17. UF <input type="text"/> <input type="text"/>	18. Zona de localização da moradia 1. Urbana <input type="checkbox"/> 2. Rural
DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS			
19. Grau de instrução do paciente 1. Analfabeto 2. Iniciou alfabetização 3. 1º grau <input type="checkbox"/> 4. 2º grau 5. 3º grau 6. Outro	20. Renda familiar mensal 1. Menor ou igual a 1 salário mínimo 2. De 2 a 4 salários mínimos 3. Mais que 5 salários mínimos 4. Biscate 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>	21. Quantas pessoas moram na casa do paciente? 1. Até 3 2. De 4 a 6 <input type="checkbox"/> 3. Mais de 6 8. Não sabe informar	22. Quantos adultos? 1. Até 2 <input type="checkbox"/> 2. De 3 a 5 3. Mais que 5
23. Quantas crianças? 1. Até 2 <input type="checkbox"/> 2. De 3 a 5 3. Mais que 5	24. Quantos locais para dormir têm na casa? 1. Um 2. De 2 a 4 <input type="checkbox"/> 3. Mais de 4 8. Não sabe informar	25. O senhor(a) ou algum adulto na casa fuma? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>	26. O senhor(a) ou alguém na casa bebe? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>
27. Existe algum caso de HIV na família? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>	28. Uso de drogas na família 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>	29. Existe alguém da família ou do convívio que faz tratamento prolongado para TB? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 3. Sim - não sabe informar a doença 8. Não sabe informar	30. Raça/Cor 1. Branca 2. Preta 3. Parda <input type="checkbox"/> 4. Amarela 5. Indígena

Apêndice C

Quantificação do alvo 85B na RT-qPCR em relação ao número de cópias por reação (μ l) e por log baseado na curva padrão externa

Quantificação do alvo 85B na RT-qPCR em relação ao número de cópias por reação (μ l) e por log baseado na curva padrão externa											
DIA 0				DIA 15				DIA 30			
	pg	cópias/ul	log		pg	cópias/ul	log		pg	cópias/ul	log
101/09	621,54	4,4 x 10 ⁹	9,65	101/09	0	0	0	101/09	0	0	0
118/10	1018,61	7,2 x 10 ⁹	9,86	118/10	547,83	3,9 x 10 ⁹	9,59	118/10	975,36	6,9 x 10 ⁹	9,84
122/10	248,87	1,7 x 10 ⁹	9,25	122/10	0	0	0	122/10	0	0	0
134/09	114,20	8 x 10 ⁸	8,91	134/09	0	0	0	134/09	0	0	0
181/09	113,01	8 x 10 ⁸	8,91	181/09	0	0	0	181/09	0	0	0
182/09	109,01	7,7 x 10 ⁸	8,89	182/09	0	0	0	182/09	0	0	0
183/09	113	7,8 x 10 ⁸	8,9	183/09	0	0	0	183/09	0	0	0
184/09	115,01	8 x 10 ⁸	8,91	184/09	0	0	0	184/09	0	0	0
185/09	1380	9,8 x 10 ⁹	9,99	185/09	0	0	0	185/09	0	0	0
186/09	205,3	1,4 x 10 ⁹	9,16	186/09	0	0	0	186/09	0	0	0
187/09	724,99	5 x 10 ⁹	9,71	187/09	0	0	0	187/09	0	0	0
190/09	2506,68	1,7 x 10 ¹⁰	10,25	190/09	0	0	0	190/09	0	0	0
192/09	161,66	1,1 x 10 ⁹	9,06	192/09	0	0	0	192/09	0	0	0
193/09	382,02	2,7 x 10 ⁹	9,43	193/09	0	0	0	193/09	0	0	0
33/09	957,01	6,8 x 10 ⁹	9,83	33/09	0	0	0	33/09	0	0	0
34/09	172,99	1,2 x 10 ⁹	9,09	34/09	0	0	0	34/09	0	0	0
35/09	976,26	6,9 x 10 ⁹	9,84	35/09	0	0	0	35/09	0	0	0
37/09	441,94	3 x 10 ⁹	9,5	37/09	0	0	0	37/09	0	0	0
40/09	1017,01	7,2 x 10 ⁹	9,86	40/09	111,76	7,8 x 10 ⁸	8,9	40/09	0	0	0
44/09	547,83	3,9 x 10 ⁹	9,59	44/09	0	0	0	44/09	0	0	0
45/09	115,99	8 x 10 ⁹	8,92	45/09	0	0	0	45/09	0	0	0
67/10	308,22	2 x 10 ⁹	9,34	67/10	0	0	0	67/10	0	0	0
76/10	382,02	2,7 x 10 ⁹	9,43	76/10	0	0	0	76/10	0	0	0
77/09	133,55	9,5 x 10 ⁹	8,98	77/09	0	0	0	77/09	0	0	0
79/09	289,61	2 x 10 ⁹	9,31	79/09	0	0	0	79/09	0	0	0
82/09	161,66	1,1 x 10 ⁹	9,06	82/09	0	0	0	82/09	0	0	0
88/10	307,82	2 x 10 ⁹	9,34	88/10	259,56	1,8 x 10 ⁹	9,27	88/10	0	0	0
175/10	297,66	2 x 10 ⁹	9,33	175/10	203,71	1,4 x 10 ⁹	9,16	175/10	0	0	0
195/10	343,36	2,4 x 10 ⁹	9,39	195/10	230,07	1,6 x 10 ⁹	9,21	195/10	0	0	0
196/10	372,74	2,6 x 10 ⁹	9,42	196/10	0	0	0	196/10	0	0	0
230/10	298,05	2 x 10 ⁹	9,33	230/10	0	0	0	230/10	0	0	0
231/10	725,03	5 x 10 ⁹	9,71	231/10	0	0	0	231/10	0	0	0
248/10	198,01	1,4 x 10 ⁹	9,15	248/10	132,15	9,4 x 10 ⁸	8,97	248/10	0	0	0
263/10	142,27	10 ⁹	9,01	263/10	105,06	7,4 x 10 ⁸	8,87	263/10	0	0	0
266/10	234,47	1,6 x 10 ⁹	9,22	266/10	287,86	2 x 10 ⁹	9,31	266/10	1200	8,5 x 10 ⁹	9,93
271/10	242,01	1,7 x 10 ⁹	9,24	271/10	0	0	0	271/10	0	0	0
5/10	3239,21	2,3 x 10 ¹⁰	10,36	5/10/	763,40	5,4x10 ⁹	9,74	5/10/	0	0	0
6/10	372,74	2,6 x 10 ⁹	9,42	6/10/	0	0	0	6/10/	0	0	0
275/10	254,35	1,8 x 10 ⁹	9,26	275/10	204,32	1,4x10 ⁹	9,16	275/10	0	0	0
278/10	242,07	1,7 x 10 ⁹	9,24	278/10	0	0	0	278/10	0	0	0

280/10	4258.97	3×10^{10}	10,48	280/10	820.75	$5,8 \times 10^9$	9,77	280/10	0	0	0
283/10	1707.04	$1,2 \times 10^{10}$	10,08	283/10	0	0	0	283/10	0	0	0
7/11	1874.99	$1,3 \times 10^{10}$	10,13	7/11	0	0	0	7/11/	0	0	0
3/11	27650.10	$1,9 \times 10^{11}$	11,29	3/11	0	0	0	3/11	0	0	0
16/11	1303	9×10^{10}	9,97	16/11	0	0	0	16/11	0	0	0
27/11	810.44	$5,7 \times 10^9$	9,76	27/11	284.59	2×10^9	9,31	27/11	0	0	0
23/11	883.38	$6,2 \times 10^9$	9,8	23/11	831.83	$5,9 \times 10^9$	9,77	23/11	281.77	2×10^9	9,3
29/11	524.38	$3,7 \times 10^9$	9,57	29/11	0	0	0	29/1	0	0	0
34/11	1163.34	8×10^9	9,92	34/11	0	0	0	34/11	0	0	0
40/11	161.66	109	9,06	40/11	0	0	0	40/11	0	0	0
44/11	1303	$9,2 \times 10^9$	9,97	44/11	0	0	0	44/11	0	0	0
53/11	161.66	$1,1 \times 10^9$	9,06	53/11	0	0	0	53/11	0	0	0

ANEXO – Parecer do CEP/FIOCRUZ



Título do Projeto: Avaliação da quantificação do RNA mensageiro (RNAm) do *Mycobacterium tuberculosis* por PCR em Tempo Real como marcador de cura de pacientes com tuberculose pulmonar.

Pesquisador responsável: Rosana de Albuquerque Montenegro

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 22/04/09

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 17/09

Registro no CAAE: 0016.0.095.000-09

PARECER Nº 38/2009

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 31 de agosto de 2012.

Recife, 31 de agosto de 2009.

Gláucia Campos da Silva

 Gláucia Campos da Silva
 Farmacêutica
 Coordenadora
 Núm. SIAPE 24631/6
 CPqAM / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 31/08/2010.

Departamento CEP - Av. Moraes Braga, 100
 CEP 50.570-420 Fone: (81) 2101.2835
 Fax: (81) 3.453.1911 - 2101.2639
 Recife - PE - Brasil
 comitetedetica@cpqam.fiocruz.br

