

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES/ FIOCRUZ-PE
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública

MARCELA PEREIRA SALAZAR

**AVALIAÇÃO DA NESTED PCR EM ÚNICO TUBO COLORIMÉTRICA EM
DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM TUBERCULOSE**

Recife
2017

MARCELA PEREIRA SALAZAR

**AVALIAÇÃO DA NESTED PCR EM ÚNICO TUBO COLORIMÉTRICA EM
DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de
mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Haiana Charifker Schindler

Coorientadora: Dra. Juliana Figueirêdo da Costa Lima Suassuna Monteiro

Recife

2017

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- S161a Salazar, Marcela Pereira.
 Avaliação da Nested PCR em único tubo colorimétrica em diferentes amostras biológicas de pacientes com tuberculose / Marcela Pereira Salazar. - Recife: [s.n.], 2017.
 89 p. : il., tab., graf.
 Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017
 Orientadoras: Haiana Charifker Schindler; Coorientadora: Juliana Figueirêdo da Costa Lima Suassuna Monteiro.
1. Tuberculose - diagnóstico. 2. Técnicas de diagnóstico molecular. 3. Reação em cadeia da polimerase. I. Schindler, Haiana Charifker. II. Título.
-
- CDU 616-002.5

MARCELA PEREIRA SALAZAR

**AVALIAÇÃO DA NESTED PCR EM ÚNICO TUBO COLORIMÉTRICA EM
DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de
mestre em Ciências.

Aprovada em 30/05/2017

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Haiana Charifker Schindler

Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

Dr^a Sílvia Maria Lucena Montenegro

Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

Dr^a Andrea Santos Lima

Faculdades Integradas de Vitória de Santo Antão e Faculdade IBGM

Dedico este trabalho à minha família, aos amigos e aos pacientes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre presente em minha vida, em todos os momentos, me mostrando os caminhos certos a seguir e me ajudando a superar os obstáculos mais difíceis.

Aos meus pais, Lena e Isaac, principalmente pelo amor incondicional dedicado a mim todos esses anos, por estarem ao meu lado nos momentos bons e difíceis, me ajudando e me orientando em todas as minhas decisões.

Ao meu irmão, Bernardo, pelo amor e carinho demonstrados todos os dias, pela amizade e companheirismo, pelos momentos de alegria e descontração.

A toda minha família, pela ajuda, amor e carinho de sempre e pelos momentos de união e descontração.

À minha orientadora, Dra. Haiana Charifker Schindler, que no início, me deu a oportunidade de ingressar na vida profissional. Agradeço também pela chance de voltar a fazer parte da melhor equipe do Aggeu Magalhães, pela oportunidade de me mostrar um caminho profissional a seguir, e por toda dedicação, ensinamentos, amor e carinho dedicados a mim.

Às minhas coorientadoras, Juliana e Lílian, pela paciência, por estarem sempre ao meu lado, me ensinando e me apoiando. Pelo carinho, amor e dedicação, por terem me dado coragem nos momentos difíceis, e pelo companheirismo e amizade de sempre.

A toda equipe do Laboratório de Imunoepidemiologia: Fabiana, Léo, Aline, Ilyana, Rosana, Andreza, Thais, Yuri, Luanna, João Paulo, Késsia, Thomaz, Thaynan, Rayssa, Duda, Michelle, Romário. Obrigada por todo apoio técnico e intelectual e por serem essa equipe maravilhosa, uma verdadeira família! Agradeço também às sempre “tuberculettes”: Deinha, Bubu, Heidi, Gabi, Ananda, Neidinha, Laís, Klarissa, Márcia, Kaly, Simone e todos que passaram pelo LIE nessa jornada! Obrigada por todo apoio, carinho e momentos de terapia!

Aos meus amigos de vida, Léo, Aline e Fabi, por estarem ao meu lado sempre, cuidando de mim, me apoiando. Muito obrigada pelo amor e amizade de vocês!

À Fabiana, pela amizade verdadeira, por todo incentivo, amor e carinho dedicados a mim. Pela confiança, por ser uma pessoa tão cheia de luz e alegria! Muito obrigada!

À Klarissa, amiga de vida e de profissão, por ter me dado suporte no projeto num momento crucial! Obrigada também por todo carinho e amizade de tantos anos!

À minha turma do mestrado, obrigada pelos momentos de aprendizagem, pelos trabalhos em grupo e também pelos momentos de descontração!

Aos amigos biomédicos da turma padrão ouro, que iniciaram comigo essa jornada e que se fizeram presentes em tantos momentos!

Às minhas amigas Érika, Cibele, e Dani, que não participaram diretamente deste trabalho, mas que foram de total importância neste momento da minha vida, como em muitos outros. Obrigada por todo amor, carinho e confiança de vocês!

Às amigas que se tornaram parte do meu dia a dia: Dani, Gabi, Ilyana, Regina, Reneta, Tauane e Sandrinha, e ao bom e velho “2º D”. Obrigada pela amizade, cafés, cervejas, festas, conversas! Isso foi fundamental durante esses dois anos!

Obrigada às pessoas do departamento de Imunologia do Aggeu Magalhães que de alguma forma contribuíram na execução deste projeto.

Obrigada a todos os médicos, enfermeiros, biólogos, biomédicos e demais profissionais que contribuíram para a conclusão deste projeto. Um agradecimento especial aos pacientes, sem os quais este trabalho não seria possível. Muito obrigada!

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho!

SALAZAR, Marcela Pereira. **Avaliação da Nested PCR em único tubo colorimétrica em diferentes amostras biológicas de pacientes com tuberculose.** 2017. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa com altas taxas de morbimortalidade no mundo. Seu diagnóstico é difícil e possui limitações, sobretudo nas formas paucibacilares. A reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo utilizada como auxiliar no diagnóstico da TB, por ser mais rápida, ter alta sensibilidade e especificidade. A Nested PCR em único tubo (STNPCR) é mais sensível, tem menor risco de contaminação cruzada e permite a identificação do *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) diretamente de amostras clínicas. A STNPCR colorimétrica é um sistema molecular rápido, de fácil execução e interpretação. O objetivo deste trabalho foi definir os parâmetros da STNPCR colorimétrica automatizada em diferentes amostras biológicas de pacientes com TB. Foram analisadas 98 amostras de plasma, 100 de células mononucleares do sangue periférico (*do inglês, peripheral blood mononuclear cells* - PBMC), 95 de urina, 20 de escarro e 5 de líquido pleural. O DNA foi extraído e submetido à STNPCR, que teve como alvo a sequência de inserção *IS6110*. Foram usados dois pares de *primers*: TJ3 e TJ5; OLI 5 e STAN 3. O OLI 5 teve adicionado à sua porção 5' uma biotina. Para a reação colorimétrica, utilizou-se uma sonda específica. Os resultados mostraram um limite de detecção do DNA de 1pg/μL em água Milli-Q®, 1fg/μL em urina, 10pg/μL em sangue (no plasma e PBMC), 1fg/μL em líquido pleural e 1fg/μL em escarro. O valor do *cut off* foi 0,092 em urina, 0,110 em plasma, 0,090 em PBMC, 0,081 em líquido pleural e 0,164 em escarro. A sensibilidade variou de 55,5% em plasma a 75,0% em líquido pleural. A especificidade variou de 51,5% em urina a 100% em líquido pleural. O índice Kappa entre a detecção colorimétrica e o gel de agarose foi substancial no escarro. Embora a sensibilidade e especificidade tenham tido grande variação, a técnica pode ser eficaz para auxiliar o diagnóstico da TB. Para a validação dos resultados, é necessário analisar um maior número de amostras biológicas.

Palavras-chaves: Tuberculose. Técnicas de diagnóstico molecular. Reação em cadeia da polimerase

SALAZAR, Marcela Pereira. **Evaluation of colorimetric single tube Nested PCR in different biological samples of patients with tuberculosis.** 2017. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease with high morbidity and mortality rates in the world. Its conventional diagnosis is difficult and has limitations, especially in paucibacillary forms. Polymerase chain reaction (PCR) has been used as an aid in the diagnosis of TB, because it is faster, has high sensitivity and specificity. Single Tube Nested PCR (STNPCR) has been shown to be more sensitive, offers a lower risk of cross-contamination and allows the identification of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) directly from clinical samples. Colorimetric STNPCR is a fast molecular system, easy to perform and interpret. The objective of this work was to define the parameters of automated colorimetric STNPCR from biological samples of TB patients. 98 samples of plasma, 100 samples of *peripheral blood mononuclear cells* - PBMC, 95 samples of urine, 20 samples of sputum and 5 samples of pleural fluid were analyzed. The DNA was extracted and submitted to STNPCR, which targeted the insertion sequence *IS6110*. Two pairs of primers were used: TJ3 and TJ5; OLI 5 and STAN 3. OLI 5 had added in its 5' portion a biotin. For the colorimetric reaction, a specific probe was used. The results showed a DNA detection limit of 1pg/ μ l in Milli-Q® water, 1 μ g/ μ l in urine, 10 μ g/ μ l in blood (both in plasma and PBMC), 1 μ g/ μ l in pleural fluid and 1 μ g/ μ l in sputum. The cut off value was 0.092 in urine, 0.110 in plasma, 0.090 in PBMC, 0.081 in pleural fluid and 0.164 in sputum. The sensitivity ranged from 55.5% in plasma to 75.0% in pleural fluid. The specificity varied from 51.5% in urine to 100% in pleural fluid. The kappa between colorimetric detection and agarose gel was substantial in the sputum. It is concluded that, although the sensitivity and specificity vary greatly, it may be useful for the diagnosis of TB. To validate the results, it is necessary to analyze a larger number of biological samples.

Key-words: Tuberculosis. Molecular diagnostic techniques. Polimerase chain reaction

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estimativa de novos casos de tuberculose no mundo em 2015.....	21
Figura 2 - Coeficiente de incidência de tuberculose no Brasil, de 2007 a 2016.	22
Figura 3 - Esquema representativo do princípio da Nested PCR.....	34
Figura 4 - Representação da fixação dos <i>primers</i> internos da STNPCR na tampa do microtubo.....	35
Figura 5 - Etapas da detecção colorimétrica em microplacas de titulação.....	39
Figura 6 - Fluxograma de seleção de pacientes, coleta e processamento das amostras biológicas.....	51
Quadro 1 - Interpretação do coeficiente de Kappa.....	57
Figura 7 - Ilustração das placas utilizadas na STNPCR colorimétrica.....	56
Figura 8 – Experimento com a curva de DNA em água Milli-Q®.	59
Figura 9 - Gel de agarose a 1,5% corado com Blue Green Loading Dye.	59
Figura 10 - Análise da curva ROC para as amostras de plasma (n=98) (a) e PBMC (n=100) (b)	61
Figura 11 - Análise da curva ROC para as amostras de urina (n=95).....	62
Figura 12 - Análise da curva ROC para as amostras de escarro (n=20).....	62
Figura 13 - Análise da curva ROC para as amostras de líquido pleural (n=5).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de casos extrapulmonares (n=39).....	57
Tabela 2 - Médias das leituras de absorvância (450nm e 620nm) do ensaio de detecção colorimétrica na avaliação do DNA extraído de cepa de referência H37Rv em diluições seriadas feitas em água Milli-Q®.....	58
Tabela 3 - Médias das leituras de absorvância (450nm e 620nm) do ensaio de detecção colorimétrica na avaliação do DNA extraído de cepa de referência H37Rv em diluições seriadas feitas nas amostras biológicas.....	60
Tabela 4 - Valor do <i>cut off</i> para as diferentes amostras biológicas através da análise da curva ROC.....	63
Tabela 5 - Análise do índice kappa entre a detecção colorimétrica e o gel de agarose nas diferentes amostras biológicas.....	64
Tabela 6 - Análise do índice kappa: detecção colorimétrica X cultura e baciloscopia em amostras de escarro.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C – Antes de Cristo

AIDS – *Acquired immunodeficiency syndrome* AUC – *Area under curve*

BAAR – Bacilo álcool ácido resistente

BCG - Bacilo Calmette-Guérin

BSA - *Bovine serum albumin*

CO₂ – Gás carbônico

Curva ROC - *Receiver operating characteristic curve* C14 – Carbono 14

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

DOTS - *Directly Observed Treatment Strategy* E – Especificidade

ETDA - *Ethylenediamine tetra acetic acid*

ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay*

ELISPOT - *Enzyme-linked immunospot*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GC – Guanina Citosina

HBL – Hospital Barão de Lucena

HC – Hospital das Clinicas

HIV – *Human immunodeficiency virus*

HOF – Hospital Otávio de Freitas

HUOC – Hospital Universitário Oswaldo Cruz

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

IAM – Instituto Aggeu Magalhães

IMIP – Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira

IGRA - *Interferon-Gamma Release Assays*

ILTb – Infecção latente por tuberculose

IFN- γ - Interferon-gama

LIE – Laboratório de Imunoepidemiologia

LJ - Lowestein-Jensen

MNT – Micobactérias não tuberculosas

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

NaOH – Hidróxido de Sódio

NPCR – *Nested polymerase chain reaction*

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – Pares de base

PBMC - *Peripheral blood mononuclear cell*

PBS- *Phosphate buffered saline*

PBST - *Phosphate buffered saline + Tween 20*

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PPD - *Purified protein derivative*

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

rDNA – Ácido desoxirribonucleico ribossomal

RM – Ressonância Magnética

S – Sensibilidade

SSC – *Saline sodium citrate*

STNPCR – *Single tube nested Polimerase Chain Reaction* TAANs - Testes de amplificação de ácidos nucleicos

TB – Tuberculose

TBEP – Tuberculose extrapulmonar

TB-MDR – Tuberculose multidroga resistente

TBP – Tuberculose pulmonar

TC – Tomografia computadorizada

TDO – Tratamento diretamente observado

TE – Tris-EDTA

TMB – Tetrametilbenzidina

TSA – Teste de sensibilidade à antimicrobianos

TT – Teste tuberculínico

UFC – Unidades formadoras de colônias

UT – Unidade tuberculina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 A tuberculose no âmbito da saúde pública.....	19
2.2.1 Tuberculose no mundo	20
2.2.2 Tuberculose no Brasil.....	21
2.2.3 Tuberculose em Pernambuco.....	22
2.3 Agente etiológico	22
2.4 Transmissão	23
2.5 Patogênese e imunidade	24
2.6 Formas clínicas da tuberculose	25
2.6.1 Tuberculose pulmonar	25
2.6.2 Tuberculose extrapulmonar	26
2.7 Diagnóstico	28
2.7.1 Diagnóstico por imagem.....	28
2.7.2 Diagnóstico Histopatológico	29
2.7.3 Diagnóstico Bacteriológico	29
2.7.3.1 Exame direto.....	29
2.7.3.2 Cultura.....	30
2.7.4 Diagnóstico Imunológico	31
2.7.5 Diagnóstico Molecular	32
2.7.5.1 Nested PCR (NPCR) e Nested PCR em único tubo (STNPCR).....	33
2.7.5.2 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	35
2.7.5.3 Gene Xpert® MTB/RIF	36
2.8 Métodos de detecção dos produtos amplificados da PCR	38
2.8.1 Eletroforese em gel de agarose	38

2.8.2 Detecção colorimétrica	38
2.9 Controle, prevenção e tratamento.....	40
3 JUSTIFICATIVA	42
4 PERGUNTA CONDUTORA	43
5 OBJETIVOS	44
5.1 Geral	44
5.2 Específicos	44
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
6.1 Informações sobre o estudo	45
6.1.1 Local de estudo e seleção das amostras.....	45
6.1.2 Definição das pacientes	45
6.1.3 Critérios de inclusão	46
6.1.4 Critérios de exclusão	46
6.1.5 Critérios de Perda	46
6.1.6 Cálculo Amostral.....	46
6.1.7 Considerações éticas.....	46
6.1.8 Armazenamento e análise dos dados	47
6.2 Métodos de coleta e processamento das amostras	47
6.2.1 Sangue	47
6.2.2 Urina	48
6.2.3 Escarro	48
6.2.4 Líquido Pleural	48
6.2.5 Cultura e identificação de micobactérias em meio Löwestein-Jensen	48
6.2.6 Extração de DNA.....	48
6.2.7 Visualização dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose	49
6.2.8 Armazenamento do material biológico.....	49
6.3 Desenvolvimento das etapas da STNPCR colorimétrica automatizada	52

6.3.1 Condições da Nested PCR em único tubo (STNPCR)	52
6.3.2 Desenho da sonda aminada.....	52
6.3.3 Placa de ELISA utilizada para a realização do ensaio.....	53
6.3.4 Etapas de lavagens.....	53
6.3.5 Protocolo desenvolvido	53
6.3.6 Definição do limite de detecção de DNA do <i>M. tuberculosis</i>	54
6.3.7 Definição do <i>cut off</i> para cada amostra clínica.....	55
6.3.8 Avaliação do desempenho da STNPCR colorimétrica automatizada	55
7 RESULTADOS	56
7.1 Definição dos parâmetros técnicos utilizados na STNPCR colorimétrica	56
7.1.1. Escolha da placa de microtitulação utilizada.....	56
7.1.2 Definição das etapas de lavagens	57
7.1.3 Definição da quantidade de amostra de DNA amplificado utilizada	57
7.2 Perfil dos pacientes e amostras clínicas	57
7.3 Avaliação do limite de detecção de DNA do <i>M.tuberculosis</i> através da STNPCR colorimétrica automatizada	58
7.3.1 Limite de detecção de DNA do <i>M. tuberculosis</i> diluído em água Milli-Q®	58
7.3.2 Limite de detecção de DNA do <i>M. tuberculosis</i> diluído nas amostras biológicas.....	60
7.4 Análise da curva ROC nas diferentes amostras clínicas.....	61
7.4.1 Curva ROC das amostras de sangue (plasma e PBMC).....	61
7.4.2 Curva ROC das amostras de urina.....	61
7.4.3 Curva ROC das amostras de escarro	62
7.4.4 Curva ROC das amostras de líquido pleural	62
7.5 Definição do valor de corte (<i>cut off</i>) através da curva ROC	63
7.6 Índice kappa: gel de agarose x detecção colorimétrica	64
7.7 Índice kappa: detecção colorimétrica x cultura e baciloscopia.....	64
8 DISCUSSÃO	66

9 CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS	77
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	89

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença crônica, que afeta o homem desde a pré-história, e permanece como uma das principais doenças infecciosas do mundo, com altas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente nos países em desenvolvimento (COMAS et al., 2013). É causada pelo complexo *Mtb*, que tem crescimento lento, e afeta primariamente os pulmões, mas pode atingir qualquer órgão do corpo, caracterizando a TB extrapulmonar (TBEP). A infecção acontece pela inalação de aerossóis expelidos através da tosse de um paciente com a forma pulmonar da doença. Entretanto, mais de 90% das pessoas infectadas permanecem num estado latente, e aproximadamente 5% a 10% irão desenvolver a doença ativa (BARRY et al., 2016; DHEDA et al., 2016).

No ano de 2015, foram estimados 10,4 milhões de novos casos de TB no mundo, e 1,4 milhões de mortes pela doença. O aumento no número de casos de coinfeção da TB com o vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus* - HIV) e de TB multidroga resistente (TB-MDR) tem contribuído para a persistência do número elevado de casos e de óbitos por TB (DHEDA et al., 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

As técnicas laboratoriais convencionais utilizadas para o diagnóstico da TB (baciloscopia e cultura) apresentam sensibilidade variada. A baciloscopia, quando executada corretamente, permite detectar de 70 a 80% dos casos de TB pulmonar (TBP) em uma comunidade. Entretanto, tem uma baixa sensibilidade para diagnosticar casos paucibacilares, aqueles casos cujas amostras têm poucos bacilos, com seus valores variando de 0 a 40%. Na cultura, método considerado padrão ouro para o diagnóstico da TB, a sensibilidade varia de 0 a 80%. Além disso, o *Mtb* tem crescimento lento, podendo requerer até 60 dias para a obtenção de um resultado definitivo, o que compromete o tratamento do paciente. Em países em desenvolvimento, a maior parte dos pacientes doentes é tratada com base em achados radiológicos e sintomas clínicos (BRASIL, 2009a; BENTO et al., 2011; LAWN; ZUMLA, 2012; MEHTA et al., 2012).

A coinfeção TB/HIV trouxe uma mudança no modo como a doença se apresenta nos pacientes. A incidência de doentes com baciloscopia negativa e as taxas de mortalidade aumentaram. Além disso, a TBEP se tornou mais comum. As formas extrapulmonares representam 15 a 20% dos casos de TB e podem constituir mais de 50% em pacientes com HIV (MEHTA et al., 2012; SCHERER et al., 2007; VITTOR et al., 2014).

Uma das alternativas para suprir as dificuldades encontradas no diagnóstico

convencional da TB é o desenvolvimento de pesquisas baseadas na amplificação de ácidos nucleicos. A reação em cadeia da polimerase (*do inglês, polimerase chain reaction – PCR*) é a técnica mais utilizada, e detecta sequências nucleotídicas diretamente de amostras clínicas, podendo dar um resultado em poucas horas (FURINI et al., 2013; LUO; BANAEI, 2013; MEHTA et al., 2012). A Nested PCR (NPCR) é uma variação da PCR convencional e oferece maior sensibilidade e especificidade, pois associa duas reações de PCR, em que uma segue a outra. A Nested PCR em único tubo (*Single Tube Nested PCR – STNPCR*) tem a vantagem de ter menor risco de contaminação cruzada, pois não é necessária a abertura dos tubos para adição de reagentes (ABATH et al., 2002; LIMA et al., 2015).

A confirmação do diagnóstico da TB se torna ainda mais difícil nos casos de TBEP. A doença é tipicamente paucibacilar, os sintomas são inespecíficos e dependem do órgão afetado. As amostras clínicas normalmente se localizam em sítios do corpo que são de difícil acesso, necessitando de procedimentos invasivos para sua coleta (MAYNARD-SMITH et al., 2014; MEHTA et al., 2012; VITTOR et al., 2014). Com a dificuldade de se obter amostras biológicas nos casos extrapulmonares, e mesmo em suspeita de TB pulmonar, muitas pesquisas moleculares vêm sendo realizadas em amostras de sangue e urina como uma alternativa para o diagnóstico da TB (DUBEY et al., 2013; HAJIABDOLBAGHI et al., 2014; HEYDARI et al., 2014; LIMA et al., 2015; MARANGU et al., 2015).

A detecção colorimétrica se baseia na técnica de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para a detecção do produto amplificado pela PCR. Uma sonda específica, complementar ao *amplicon* gerado pela PCR, é previamente fixada na placa, onde o DNA amplificado é colocado posteriormente. A revelação acontece depois da adição de um substrato específico, que reage com a enzima e forma uma coloração. A leitura é feita em leitor de ELISA através da densidade ótica. Possui como vantagens a objetividade na interpretação dos resultados, a possibilidade de análise de várias amostras de uma só vez e não necessita de equipamentos sofisticados e caros, sendo possível o seu uso em laboratórios clínicos, especialmente em países com recursos limitados (CARDOSO, 2013; ROSSETTI et al., 2006; SUE et al., 2014). A automatização desta técnica, com uso de lavadora e incubadora automática de microplacas, junto à STNPCR, oferece um sistema de diagnóstico mais rápido e preciso.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A tuberculose no âmbito da saúde pública

A TB é uma doença antiga, datada de mais de 5.000 anos a.C, por evidências arqueológicas que encontraram vestígios da doença em múmias egípcias (MACIEL et al., 2012). Ao longo da evolução da humanidade, com o crescimento acelerado da população mundial e com o processo de industrialização, os países passaram a sofrer mudanças no perfil epidemiológico das doenças. Na teoria da transição epidemiológica, dois fatores principais condicionaram as mudanças no perfil das doenças: alterações na estrutura etária da população e alterações no perfil de morbidade e mortalidade das doenças, com substituição das doenças infecto parasitárias pelas doenças crônico-degenerativas e as causas externas (MEDRONHO; BLOCH, 2008).

O advento da síndrome da imunodeficiência humana adquirida (*Acquired immunodeficiency syndrome* – AIDS), na década de 1980, foi o fato mais importante quando se acreditava no fim ou numa redução das doenças infecciosas. Entretanto, o comportamento destas doenças não mostrou um perfil evolucionista (MEDRONHO; BLOCH, 2008; PAZ; BERCINI, 2009). No Brasil, a TB é considerada uma doença persistente, pois não houve um declínio significativo do número de casos pela doença ao longo dos anos, permanecendo com uma taxa de incidência elevada, principalmente após a descoberta da AIDS (PAZ; BERCINI, 2009).

A TB é uma doença fortemente marcada pelas condições socioeconômicas da população. As condições de vida das pessoas, como pobreza, moradias inadequadas e aglomeradas, influenciam diretamente no processo de transmissão da doença. O quadro da TB como problema de saúde pública se agrava porque a doença tem uma ampla dispersão geográfica, pela coinfeção com o HIV, condição que deixa o indivíduo mais vulnerável à TB, e pelo aparecimento de casos multirresistente às drogas (SAN PEDRO; OLIVEIRA, 2013). Além de estar intimamente relacionada às desigualdades sociais, a TB ainda causa repercussões sociais, uma vez que acomete grupos mais vulneráveis e uma parcela da população economicamente ativa, impactando diretamente na economia e gerando sofrimento para os pacientes e para aqueles relacionados a eles (BERTOLOZZI et al., 2014).

2.2 Epidemiologia

2.2.1 Tuberculose no mundo

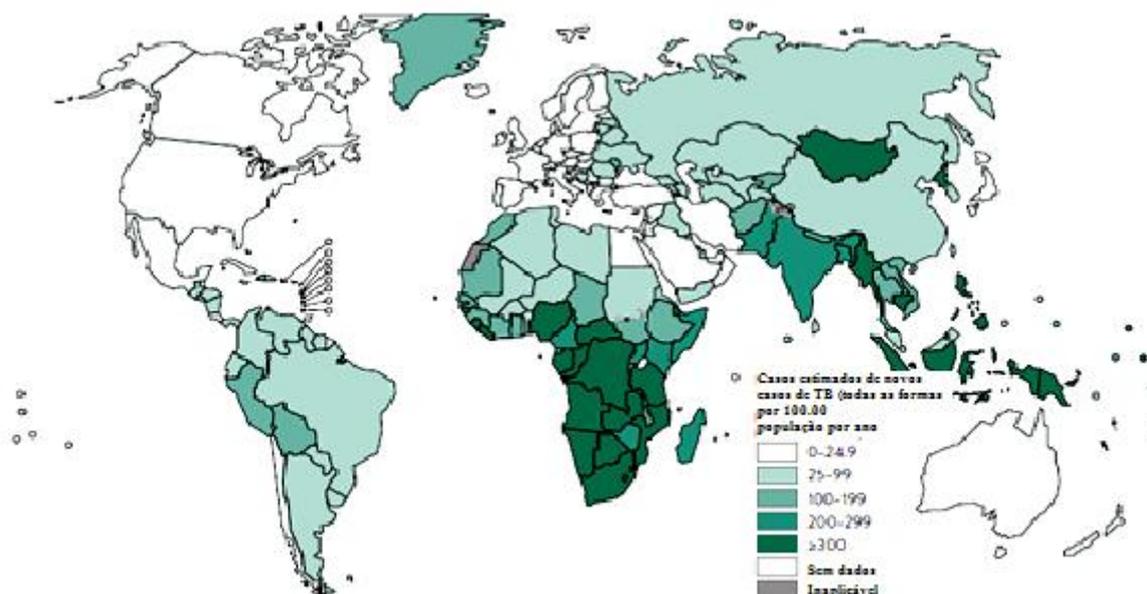
A TB é uma doença prevalente, de distribuição mundial, e ao lado do HIV, consiste em uma das doenças infecciosas que mais causa mortes no mundo, principalmente em países em desenvolvimento (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015; PEDRO et al., 2015).

No ano de 2015, foram estimados 10,4 milhões de novos casos de TB no mundo, e 1,4 milhões de mortes pela doença. Dos casos estimados, 1,2 milhões (11%) ocorreram em pacientes HIV positivos, com cerca de 400.000 óbitos entre esses pacientes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016; PEDRO et al., 2015). A prevalência da TB vem caindo ao longo dos anos. No ano de 2015, a taxa de prevalência foi 42% menor do que no ano de 1990. Embora haja um declínio, o número de casos da doença ainda é considerado elevado. O número de óbitos pela doença também diminuiu, houve uma redução de 22% no número de mortes de 2000 até 2015. Ainda assim, a TB encontra-se entre as dez principais causas de mortes no mundo em 2015 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015, 2016).

Dos 10,4 milhões de novos casos de TB no mundo, 5,9 milhões ocorreram em homens, 3,5 milhões entre as mulheres e 1 milhão entre crianças. Os homens podem estar mais expostos ao bacilo, pois, historicamente, eles são os provedores da família, resultando em uma maior exposição fora de casa. Biologicamente, eles também são mais suscetíveis a desenvolver a doença. Acrescenta-se a isso, o fato de que os homens podem ser menos propensos do que as mulheres a procurar cuidados com a saúde (BELO et al., 2002; HORTON et al., 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016; SMITH et al., 2016). Mesmo a TB sendo mais diagnosticada no sexo masculino, a doença é uma das principais causas de morte por doença infecciosa entre as mulheres, e afeta principalmente a idade economicamente ativa, sendo o impacto da doença fortemente sentido entre seus filhos e familiares (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016; SÁ et al., 2012).

O continente africano é o que concentra o maior número de casos da doença: 28% de todos os casos em 2014. O coeficiente de prevalência supera a média global, sendo de 281 casos/100 mil habitantes, mais do que o dobro do coeficiente global, que é de 133 casos/100 mil habitantes. Atualmente, seis países são responsáveis por 60% dos casos da doença no mundo: Índia, Indonésia, China, Nigéria, Paquistão e África do Sul (Figura 1) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015, 2016).

Figura 1- Estimativa de novos casos de tuberculose no mundo em 2015.

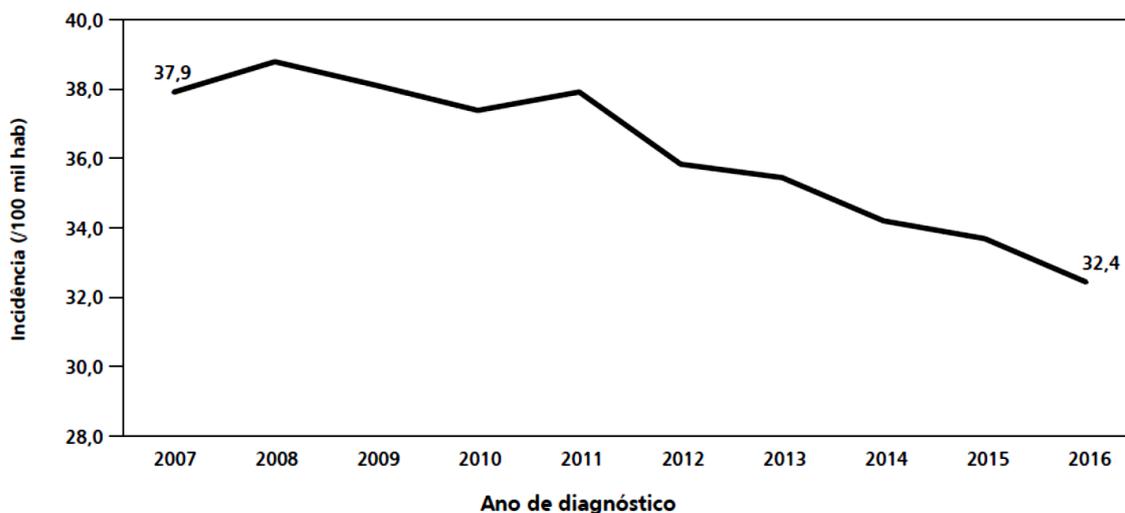


Fonte: Organização Mundial da Saúde (2016)

2.2.2 Tuberculose no Brasil

O Brasil encontra-se entre os 20 países no mundo com maior número absoluto de casos de TB. Ainda que o coeficiente de incidência tenha diminuído entre os anos de 2007 e 2016, passando de 37,9 para 32,4 casos/100 mil habitantes (Figura 2), o número de casos ainda é muito elevado, sendo registrados no Brasil aproximadamente 67 mil novos casos em 2016. O número de óbitos também diminuiu, sendo reduzido em 15,4% entre os anos de 2006 a 2015. Entretanto, foram registrados cerca de 4.500 óbitos pela doença no ano de 2015, um número considerado alto, visto que a TB é uma doença que tem cura (BERTOLOZZI et al., 2014; BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2017; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

Figura 2 Coeficiente de incidência de tuberculose no Brasil, de 2007 a 2016.



Fonte: Boletim Epidemiológico (2017)

2.2.3 Tuberculose em Pernambuco

A região Nordeste ocupa atualmente o terceiro lugar em número de casos novos de TB entre as regiões do Brasil, e o primeiro lugar em número de óbitos pela doença. Pernambuco é um dos estados do Brasil com maiores taxas de incidência, ocupando atualmente o terceiro lugar em número de casos novos de TB entre os estados brasileiros, e a primeira posição na região Nordeste (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2017).

Entre as capitais brasileiras, Recife ocupa a terceira posição, com um coeficiente de incidência de 78,3 casos novos/100 mil habitantes, maior do que a média nacional, que é de 30,9/100 mil habitantes. Em relação ao número de óbitos pela doença, Pernambuco aparece em segundo lugar em taxa de mortalidade por TB, com um coeficiente de 4,5 óbitos/100 mil habitantes, assim como Recife, que entre as capitais brasileiras, possui uma taxa de mortalidade de 7,7 óbitos/100 mil habitantes, ocupando o primeiro lugar entre as capitais (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016, 2017).

2.3 Agente etiológico

A TB é causada pelas espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que inclui: *M. tuberculosis*, que do ponto de vista sanitário é a espécie mais importante, pois é a causadora da TB em humanos; *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canetti*, *M. microti* e *M. pinnipedi*.

A espécie *M. africanum* também causa TB em humanos, mas apenas em algumas regiões da África (DELOGU et al., 2013). As espécies do complexo *Mtb* são bacilos retos ou ligeiramente curvos, não esporulados e não encapsulados. O *Mtb* é uma bactéria de crescimento lento, parasita intracelular aeróbio estrito, necessitando de oxigênio para crescer e multiplicar-se (BRASIL, 2014).

O *Mtb* possui como uma de suas maiores características a estrutura de sua parede celular, que lhe proporciona uma forte barreira de impermeabilização a compostos nocivos e às drogas, o que é um fator importante e fundamental da sua virulência (DELOGU et al., 2013). Tem uma membrana externa, que consiste em uma bicamada lipídica, formada por ácidos micólicos e por glicolipídeos e componentes cerosos. Os ácidos micólicos são utilizados na identificação das espécies de micobactérias. A ligação desses ácidos com a fucsina, corante utilizado para identificar as bactérias, gera complexos resistentes à descoloração com álcool-ácido. Por este motivo, estes bacilos são chamados de bacilos álcool ácidos resistentes (BAAR). Entretanto, esta característica tintorial não diferencia nem define as espécies de micobactérias, sendo necessária a utilização de testes fenotípicos ou moleculares para sua identificação (BRASIL, 2008; DELOGU et al., 2013).

O genoma da cepa de referência *do Mtb*, a H37Rv, é composto por $4,4 \times 10^6$ pares de base (pb), rico em regiões de GC, e possui aproximadamente 4.000 genes. Mais de 200 genes estão relacionados com enzimas que codificam o metabolismo de ácidos graxos. A grande quantidade destas enzimas pode estar relacionada à habilidade do patógeno de se multiplicar em tecidos do hospedeiro, onde os ácidos graxos talvez sejam a maior fonte de carbono (GALAGAN, 2014; SMITH, 2003).

2.4 Transmissão

A TB é transmitida de pessoa a pessoa, por gotículas que são lançadas no ar através da tosse, espirro ou fala de pessoas com a doença pulmonar ativa. Cada gotícula contém em seu interior de 1 a 10 bacilos, com diâmetro variando de 1 a 5µm. As gotículas mais pesadas se depositam no solo e as mais leves ficam suspensas no ar por longos períodos de tempo, podendo ser inaladas, chegando até os alvéolos, onde se replicam (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1999; LEE, 2016).

Algumas condições são importantes para a transmissão da TB: a doença é uma infecção que necessita apenas do contato por via aérea para a transmissão; a infecciosidade em paciente com TB é muito variada; a infecciosidade é bastante reduzida quando o

tratamento efetivo é iniciado. No Brasil, estima-se que, no período de um ano, em uma comunidade, um paciente bacilífero, ou seja, aquele com baciloscopia do escarro positiva, infecta 10 a 15 pessoas, em média. Por isso, a estratégia mais importante para a redução da transmissão da TB é o tratamento específico das pessoas doentes (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1999; BRASIL, 2014; LEE, 2016).

A probabilidade de transmissão da doença é influenciada pelo número e pela concentração de organismos que são expelidos no ar, pelo período de tempo que uma pessoa exposta respira o ar contaminado, pela virulência e infecciosidade dos bacilos, pela imunidade do indivíduo exposto e pelos fatores ambientais e sociais (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1999; BRASIL, 2014; LEE, 2016).

A imunidade do hospedeiro tem papel importante para a infecção e desenvolvimento da doença. Pacientes HIV positivos ou que estejam com o sistema imune deprimido por outras razões, como os pacientes portadores de neoplasias, pacientes que fazem uso de imunossupressores, pacientes desnutridos, idosos e diabéticos, são mais propensos a se infectarem e a desenvolver a doença (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1999; BERTOLOZZI et al., 2014; BRASIL, 2014).

Em relação a TB extrapulmonar, a maioria dos casos ocorre através da disseminação do bacilo por via linfohematogênica, a partir do complexo pulmonar primário, sendo assim considerada parte do grupo de tuberculoses primárias. Pacientes com TBEP são paucibacilares e, portanto, não transmitem a doença (QUEIROZ, 2008; ROCHA et al., 2008).

2.5 Patogênese e imunidade

Ao serem inalados, parte dos bacilos será retida pelas defesas físicas do organismo. Outra parte pode avançar e atingir os pulmões. Ao chegarem aos pulmões, os bacilos são fagocitados pelos macrófagos e desenvolve-se o complexo primário pulmonar. Em seguida, há disseminação do bacilo pela via linfohematogênica. A chance de um microorganismo inalado estabelecer uma infecção depende da virulência bacteriana e da capacidade microbicida do macrófago alveolar que o fagocita. Os microorganismos crescem por 2 a 10 semanas, tempo necessário para ativar a resposta imune celular (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1999; CAMPOS, H., 2006a).

A infecção pelo *Mtb* pode tomar três caminhos: ser combatido na porta de entrada, através da imunidade inata; progredir para a doença ativa; ou se tornar latente. Na grande maioria dos casos (95%) a infecção evolui para a latência. Apenas 5% desenvolverão a

doença na primoinfecção. Na latência, os bacilos ficam encapsulados, em pequenos focos (granulomas) que não progridem, nem provocam o adoecimento. Na TB latente, o organismo controla, mas não elimina a infecção (BRASIL, 2014; LAPA E SILVA; BOÉCHAT, 2004).

A imunidade para TB é mediada pelo sistema imunológico celular, timo-dependente, através da interação entre linfócitos T *helper* ativados e macrófagos, com a liberação de citocinas específicas, especialmente interferon-gama (IFN- γ), principal citocina inflamatória observada na TB, e que estão relacionadas com a ativação do mecanismo de imunidade celular do tipo Th1 (GUEDES, 2013).

O macrófago, após a fagocitose do bacilo, libera quimiocinas que ativam outras células do sistema imunológico, como neutrófilos, monócitos, linfócitos, que se juntam para tentar destruir a bactéria. A interação destas células cria um ambiente repleto de citocinas, desfavorável ao bacilo. Além da produção de citocinas, os macrófagos ativados pelo *Mtb* processam e apresentam antígenos. Este é o início da resposta imune específica, que pode ser mediada por anticorpos ou células e que mantêm a memória imunológica, reagindo frente a um novo ataque de micobactérias. As células T CD4 e T CD8 são de grande importância, pois participam ativamente da resposta imune contra os bacilos infectantes (BRASIL, 2009^a; CAMPOS, 2006a; ROSEMBERG, 2001).

A lesão granulomatosa inicia-se com a chegada dos linfócitos T ao local da infecção. O granuloma é formado por neutrófilos, monócitos, células T e B que circundam os macrófagos infectados, células dendríticas e fibroblastos. O granuloma é o que limita a disseminação do *Mtb*, e cria um ambiente para a interação da resposta entre linfócitos T e macrófagos ativados pelo IFN- γ , o que impede a multiplicação do bacilo. Com o desenvolvimento dessa imunidade celular, o centro do granuloma sofre um processo de necrose de caseificação. O meio necrótico é adverso à bactéria, que deprime sua atividade metabólica e fica dormente, condição na qual pode sobreviver por décadas, podendo sofrer reativação (CAMPOS, 2006a; MOUTINHO, 2011).

2.6 Formas clínicas da tuberculose

2.6.1 Tuberculose pulmonar

A TB pulmonar é a principal forma clínica da doença, uma vez que o *Mtb* é uma bactéria aeróbia, e tem predileção pelos pulmões. Representa 80 a 85% dos casos, e é a forma

clínica responsável pela transmissão da doença (BRASIL, 2011; PEDRO et al., 2015). A TB pulmonar se manifesta através de sintomas como tosse, que pode apresentar muco ou sangue, dor torácica, fraqueza, perda de peso, febre e suor noturno. Algumas vezes, a TB pode cursar, em seu início, sem sintomas específicos (FERRI et al., 2014).

2.6.2 Tuberculose extrapulmonar

A TB extrapulmonar se caracteriza pela infecção pelo *Mtb* em outros órgãos do corpo, fora do parênquima pulmonar. Ocorre em órgãos sem condições ótimas de crescimento para o bacilo, sendo quase sempre de instalação lenta (LOPES et al., 2006). Existem várias formas de TBEP. No Brasil, as formas mais frequentes são: pleural, ganglionar, meningoencefálica, miliar, laríngea, pericárdica, osteoarticular, urogenital, ocular e peritoneal (BRASIL, 2014; MEHTA et al., 2012;).

A TB pleural representa de 3 a 25% dos casos de TBEP. É causada por reações de hipersensibilidade contra antígenos do *Mtb*, que acontecem no espaço pleural. É a forma mais frequente de TBEP. Seus sintomas podem ser parecidos com os da infecção pulmonar, uma vez que o paciente pode apresentar dor torácica (MEHTA et al., 2012; SANTOS, 2012; RAMIREZ-LAPAUSA et al., 2015).

A TB ganglionar é uma das formas mais comuns de TBEP. Geralmente afeta crianças a adultos jovens e está relacionada com a infecção pelo HIV. Esta forma decorre da disseminação dos bacilos, e os locais mais acometidos são as regiões cervicais, supraclaviculares, hilares e mediastinais. O quadro clínico costuma apresentar emagrecimento, febre e aumento progressivo dos linfonodos (CAPONE et al., 2006; RAMIREZ-LAPAUSA et al., 2015).

A TB meningoencefálica é uma das formas mais graves da TBEP e pode acometer de 7 a 12% dos pacientes. Por ser uma forma mais severa, este tipo de TB tem uma alta taxa de morbidade e mortalidade: 25% podem sofrer algum tipo de sequelas. Há um acometimento das meninges, do parênquima cerebral e da medula espinhal. O acometimento do sistema nervoso central acontece por disseminação hematogênica ou durante a forma disseminada da doença (CAPONE et al., 2006; MEHTA et al., 2012; RAMIREZ-LAPAUSA et al., 2015).

A TB miliar refere-se às formas potencialmente letais da TB, que se dissemina por via hematogênica por todo o corpo, podendo atingir inúmeros órgãos. Pode ocorrer como resultado de uma primoinfecção ou por reativação de um foco latente. Os órgãos mais

comumente atingidos são fígado, baço, pulmão, linfonodos, meninges, medula óssea e glândula suprarrenal. Este tipo de TB normalmente atinge idosos, pacientes desnutridos e imunodeprimidos. O diagnóstico é difícil porque os sintomas são confundidos com outras doenças e os sintomas torácicos não são específicos (MEHTA et al., 2012; RAMIREZ-LAPAUSA et al., 2015).

A TB laríngea normalmente está associada à TBP. É uma forma clínica altamente bacilífera e contagiosa. O principal sintoma é a disfonia, mas pode haver tosse, estridor e hemoptise (RAMIREZ-LAPAUSA et al., 2015).

A TB pericárdica normalmente está associada com uma infecção concomitante em outros órgãos. Pode ocorrer por disseminação hematogênica ou durante uma reativação endógena do foco pulmonar. Os principais sintomas são dor torácica e dispnéia (CAPONE et al., 2006; RAMIREZ-LAPAUSA et al., 2015).

A TB osteoarticular representa até 11% dos casos de TBEP e pode acometer qualquer osso do corpo. O envolvimento do corpo vertebral com a destruição do disco vertebral é característico da espondilite tuberculosa ou Mal de Pott, que representa 50% dos casos de TB osteoarticular (CAPONE et al., 2006; RAMIREZ-LAPAUSA et al., 2015).

A TB urogenital normalmente acontece por disseminação hematogênica, mas pode ocorrer por reativação da doença ou através da TB miliar. É mais incidente em homens, e se manifesta com sintomas de uma infecção urinária, com febre, disúria e hematúria. Pode representar até 6,5% dos casos de TBEP (CAPONE et al., 2006; RAMIREZ-LAPAUSA et al., 2015).

A TB ocular é uma forma rara da doença. O comprometimento ocular também ocorre pela disseminação do bacilo através do sangue. As uveítes são a manifestação mais frequentes (CAPONE et al., 2006; MEHTA et al., 2012).

A TB peritonal corresponde ao envolvimento do trato gastrointestinal, embora a região íleocecal seja o sítio mais comumente envolvido. Dor abdominal não específica é o sintoma mais comum, aparecendo em 80 a 90% dos pacientes. Pode ocorrer devido à ingestão de leite contaminado com *M. bovis*, por deglutição do escarro contaminado, por disseminação hematogênica ou nos casos de TB miliar (RAMIREZ-LAPAUSA et al., 2015).

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico precoce do paciente com TB, especialmente o paciente bacilífero, aquele com baciloscopia positiva, que ao tossir ou falar elimina o bacilo, é muito importante. Tratá-lo corretamente permite que ele seja curado, eliminando assim uma fonte de infecção. Ao eliminar a fonte de infecção, a cadeia de transmissão da doença é interrompida (CAMPOS, H., 2006b; BRASIL, 2014; AGRAWAL et al., 2016). O diagnóstico clínico da TBP baseia-se nos sinais e sintomas apresentados pelo paciente doente (FERRI et al., 2014; PEDRO et al., 2015).

Para os casos de TBEP, que geralmente são mais graves, o diagnóstico precoce melhora o prognóstico do paciente. Existe uma dificuldade maior de diagnosticar os casos de TBEP, pois são amostras clínicas paucibacilares, não há uma uniformidade na distribuição dos bacilos na amostra e os sítios de infecção são de difícil acesso. Além disso, a ausência de granulomas nos tecidos não exclui a possibilidade da doença, e os sintomas são inespecíficos (CAPONE et al., 2006; LAWN; ZUMLA, 2012; MEHTA et al., 2012).

2.7.1 Diagnóstico por imagem

Dentre as técnicas de diagnóstico por imagem, o raio X de tórax é a mais utilizada na detecção da TBP. Uma imagem radiológica sugestiva associada a achados clínicos ajudam na elucidação diagnóstica. Os padrões radiológicos encontrados na TBP variam dependendo da evolução da doença. Na TB primária, a radiografia do tórax pode ser normal ou apresentar pequenos nódulos periféricos. A linfonodomegalia mediastinal é a alteração mais comum na TB primária (BOMBARDA et al., 2001; FERRI et al., 2014; SILVA, 2012;). Na fase ativa da doença, a presença de cavitações pode acometer 27 a 50% dos casos, e estas cavitações estão presentes nas partes ápico-posteriores dos lobos superiores ou superiores dos lobos inferiores, com paredes espessas durante a fase ativa da doença. Após a cura cicatrizam, e aparecem no raio X como granuloma calcificado (BOMBARDA et al., 2001; FERRI et al., 2014).

Para a TBEP, não existe nenhum padrão radiológico específico em nenhuma forma da doença. Ainda assim, a radiografia de tórax é importante para auxiliar no diagnóstico, visto que a presença de uma lesão no pulmão pode ser indicativa de uma primoinfecção pelo *Mtb* (CAPONE et al., 2006; LOPES et al., 2006). Outros exames de imagem, como a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM) são mais utilizadas para auxiliar o

diagnóstico das formas extrapulmonares. As características radiológicas dependem do órgão envolvido e podem ser confundidas com outras doenças. Por isso, é importante conhecer as características radiológicas da TB, que em associação com as manifestações clínicas, ajudam no diagnóstico precoce e no início do tratamento específico (GAMBHIR et al., 2016).

2.7.2 Diagnóstico Histopatológico

Para o diagnóstico da TBEP, o exame histopatológico das amostras de biópsias é importante, pois pode ajudar na confirmação da doença. O exame mostra a formação de um granuloma necrotizante, com presença de macrófagos, linfócitos e células gigantes de Langhans. Entretanto, a presença do granuloma apenas sugere a presença de TB, mas não afasta a possibilidade de outras doenças. Por isso é importante excluir a presença de outras doenças, infecciosas ou não (LOPES et al., 2006; RAMIREZ-LAPAUSA et al., 2015). O exame histopatológico também não diferencia a TB da infecção causada por micobactérias não tuberculosas (MNT), uma vez que a infecção por MNT também mostra a formação de um granuloma com necrose de caseificação (CAMPOS, 2000).

2.7.3 Diagnóstico Bacteriológico

2.7.3.1 Exame direto

O exame direto ou baciloscopia é uma técnica rápida, que consiste na visualização microscópica das micobactérias. O exame pesquisa BAAR em um esfregaço de amostra clínica, que é corado pelo método de Ziehl Neelsen. Por esta técnica, os bacilos se coram pela fucsina básica, e apresentam cor avermelhada após a descoloração com álcool-ácido (BRASIL, 2008; BENTO et al., 2011).

A baciloscopia é largamente utilizada no diagnóstico da TB, por ser uma técnica de baixo custo e fácil execução. É fundamental, do ponto de vista epidemiológico, pois detecta os pacientes bacilíferos, que são as fontes de infecção da doença. Entretanto, é uma técnica que possui baixa sensibilidade, variando de 60 a 80%, quando comparada à cultura, podendo ter valores ainda mais baixos (BRASIL, 2008; PEDRO et al., 2015). Além da sua baixa sensibilidade, o exame direto não é específico, uma vez que detecta apenas BAAR, sem fazer distinção entre as espécies de micobactérias (LAWN; ZUMLA, 2012; MEHTA et al., 2012; PEDRO et al., 2015).

2.7.3.2 Cultura

A cultura é o método considerado padrão ouro para o diagnóstico da TB. Possui alta sensibilidade e especificidade, requerendo de 10-100 bacilos por mililitro da amostra. A especificidade é maior que 99%, e quando realizados os testes de identificação do complexo *Mtb*, a especificidade chega a 100% (BRASIL, 2008). A técnica consiste no isolamento das micobactérias a partir de amostras clínicas. Os meios mais utilizados são os que têm a base de ovos, como o Löwenstein-Jensen (LJ) e o Ogawa-Kudoh, que utilizam o verde de malaquita como corante, pois este tem o poder de inibir a microbiota contaminante. Além disso, as amostras passam por uma preparação antes de serem semeadas. Amostras consideradas contaminadas, como urina, escarro, secreções, lavado brônquico e lavado gástrico são descontaminadas através do uso do hidróxido de sódio (NaOH) e um ácido. As amostras de líquido, líquidos pleural, sinovial, peritoneal e pericárdico, fragmentos de órgãos, sangue e medula óssea são consideradas estéreis e não sofrem o processo de descontaminação (FERRI et al., 2014; PEDRO et al., 2015).

Além de ser mais sensível, o cultivo das micobactérias em meio de cultura permite ainda que a espécie seja identificada e que seja feito o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA). Em casos de TBP com baciloscopia negativa, a cultura pode aumentar em até 30% a probabilidade de se obter um diagnóstico da doença (PEDRO et al., 2015). Entretanto, devido à característica de crescimento lento do bacilo, só se obtém resultados de 4 a 8 semanas após inoculação em meio sólido. Para amostras extrapulmonares, sua sensibilidade varia de 0 a 80% (LAWN; ZUMLA, 2012; MEHTA et al., 2012; PEDRO et al., 2015; RYU, 2015).

Existem ainda os meios de cultura líquidos, com sistemas automatizados, entre eles o sistema Septi-Chek AFB e o sistema de tubo indicador de crescimento microbiano – BACTEC 960 - MGIT. Os sistemas líquidos são mais sensíveis e melhores para o isolamento do bacilo quando comparados com os meios sólidos, podendo aumentar em cerca de 10% a sensibilidade, e reduzem também o tempo decorrido para o diagnóstico final da TB, de semanas para dias (demoram em média 10 a 14 dias). Para o teste de sensibilidade às drogas, o tempo também é reduzido para 10 dias contra 4 a 8 semanas em meio sólido (ANOCHIE et al., 2012; RYU, 2015).

O sistema Septi-Chek AFB (Roche Diagnostic Systems, Nutley, N.J.) utiliza um tampão contendo o caldo Middlebrook 7H9 sob CO₂, e permite a diferenciação do *Mtb* das micobactérias não tuberculosas (MNT). Requer cerca de 3 semanas de incubação, mas a

incubação com CO₂ facilita a detecção precoce de culturas positivas. O sistema MGIT (MGIT 960; Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) permite identificar o consumo de oxigênio das micobactérias, contendo o meio Middlebrook 7H9 e um metal, o rutênio, que desempenha o papel de sensor químico fluorescente. Embora o crescimento micobacteriano seja mais rápido nos sistemas líquidos automatizados, o custo ainda é muito elevado e estes testes não identificam culturas contaminadas, levando a resultados falso-positivos (ANOCHIE et al., 2012; BRASIL, 2008; RYU, 2015).

O diagnóstico da TB-MDR é feito através do TSA, que é realizado através da cultura, em meio sólido ou líquido, sendo importante para identificar corretamente a resistência à rifampicina ou isoniazida. A detecção precoce da resistência aos fármacos é fundamental para que o tratamento específico possa ser iniciado corretamente, aumentando a probabilidade do sucesso terapêutico (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

2.7.4 Diagnóstico Imunológico

O teste tuberculínico (TT) ou teste de Mantoux consiste de uma reação intradérmica que avalia, in vivo, a resposta imune celular do hospedeiro contra um derivado proteico purificado (*purified protein derivative* – PPD) do *Mtb*. A formação de uma reação na pele diz apenas se o indivíduo já teve contato com o bacilo da TB anteriormente. O sistema imune do hospedeiro toma conhecimento da presença da proteína, chamada tuberculina, no organismo, pela ação de linfócitos de memória, e ativa o sistema imune celular, através de uma reação de hipersensibilidade tardia (BRANCO; ROCHA, 2012; GUEDES, 2013; BRASIL, 2014).

No Brasil, a proteína utilizada é a PPD RT-23 que é aplicada no terço anterior do antebraço esquerdo, por via intradérmica, na dose de 0,1mL, contendo 2UT (unidades de tuberculina). A leitura da reação é feita de 48 a 72h após a inoculação, e pode ser feita até 96h depois. A medida é feita com régua milimetrada, pela medição do diâmetro transversal da endureção palpável, e o resultado é registrado em milímetros (BRASIL, 2014).

O teste tuberculínico é usado para o diagnóstico da infecção latente da TB (ILTb), na avaliação dos comunicantes, ou seja, aquelas pessoas que tem contato com o paciente bacilífero e são assintomáticas, além de ser importante para o diagnóstico da TB ativa em crianças. A interpretação do resultado e a conduta médica dependem dos seguintes fatores: o risco de adoecer por TB, o tamanho do diâmetro, a idade, e a epidemiologia, ou seja, a probabilidade de ser um indivíduo com TB latente (BRANCO; ROCHA, 2012; BRASIL, 2014). O teste de Mantoux, entretanto, possui baixa especificidade, podendo apresentar

resultados falso-positivos, pois pode haver reação cruzada com a vacina BGC (*Bacillus Calmette-Guerin*) de *M.bovis* e com outras micobactérias não causadoras de TB (MNT). Possui também baixa sensibilidade em indivíduos imunodeprimidos, como em pacientes HIV positivos, pois há uma diminuição da resposta das células mononucleares periféricas, que diminui a chance de desenvolver a hipersensibilidade cutânea tardia e o reconhecimento de antígenos (FERRI et al., 2014; GUEDES, 2013).

O diagnóstico imunológico da TB também pode ser feito, mais recentemente, pelos ensaios de liberação de interferon-gama (*Interferon-Gamma Release Assays - IGRAs*). O princípio da técnica é que quando estimuladas por antígenos específicos do *Mtb* as células T liberam interferon-gama (IFN- γ). A técnica é realizada *in vitro*, e utilizam os antígenos ESAT-6, CFP-10 e TB7. 7. O *IGRA* tem maior especificidade em relação ao teste de Mantoux porque estes antígenos não estão presentes na vacina BCG e na maioria das outras micobactérias. O *IGRA* também apresenta outras vantagens: é mais sensível que o teste tuberculínico, tem a possibilidade de se incluírem controles positivos e negativos, não necessitam que o paciente retorne para leitura e é mais rápido, sendo seu resultado obtido em até 24h, enquanto que o PPD demora de 48h até 72h (MACHADO et al., 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011; SUCCI, 2014).

Atualmente, estão disponíveis no mercado dois kits comerciais do *IGRA*: o QuantiFERON-TB Gold in Tube (QFT-GIT, Cellestis, Austrália) e o T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, UK). O primeiro é um ensaio enzimático de imunoabsorção que avalia os níveis de IFN- γ produzidos em resposta a três antígenos específicos do *M. tuberculosis*: ESAT-6, CFP-10 e TB7. 7. Já o T-SPOT.TB mede a quantidade de células mononucleares periféricas que produzem IFN- γ frente a dois antígenos específicos: ESAT-6 e CFP-10, sendo o seu princípio baseado em *Enzyme-linked immunospot* (ELISPOT) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011; SUCCI, 2014).

2.7.5 Diagnóstico Molecular

A utilização de métodos moleculares para o diagnóstico da TB surgiu como uma necessidade global para o controle da doença. O diagnóstico molecular começou a ser estudado e avaliado em decorrência da emergência e reemergência de doenças infecciosas, inclusive a TB. As técnicas moleculares são mais rápidas e sensíveis, comparadas aos métodos de diagnóstico convencional da doença. Os testes de amplificação de ácidos

nucleicos (TAANs) são bastante utilizados, e entre eles, a técnica mais difundida é a PCR, que é um método de clonagem *in vitro* proposto por Kary Mullis em 1987 (MELO, 2006; MOLINA; TOBO, 2004; WILSON, 2011).

A PCR é uma técnica rápida, que tem alta sensibilidade e especificidade. Consiste na síntese de regiões de DNA específicas, através do uso de dois iniciadores (oligonucleotídeos) que hibridizam fitas opostas de DNA. A reação acontece em ciclos repetidos, sendo a molécula de DNA duplicada a cada ciclo. Ao final da reação, a molécula é amplificada mais de um bilhão de vezes. Acontece em três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A PCR detecta sequências nucleotídicas diretamente de amostras clínicas, e pode dar resultado em poucas horas (FURINI et al., 2013; GANAVALLI et al., 2013; LIMA et al., 2009; LIRA, 2012; MEHTA et al., 2012; ROSSETTI et al., 2006).

Atualmente, existem muitas variantes da técnica de PCR convencional, entre elas a NPCR e a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), que vêm sendo desenvolvidas com o intuito de aumentar a sensibilidade da técnica para a detecção do DNA alvo (LIMA et al., 2009; CRUZ et al., 2011; LIRA, 2012; SALAZAR, 2012; SANTOS, 2012).

2.7.5.1 *Nested PCR (NPCR) e Nested PCR em único tubo (STNPCR)*

A NPCR consiste na utilização de duas PCRs e utiliza dois conjuntos de oligonucleotídeos em reações subsequentes, onde o produto amplificado na primeira reação é usado como molde para a segunda reação, oferecendo mais sensibilidade e especificidade à técnica (Figura 3) (LIMA et al., 2009, 2015). A STNPCR é uma variação da NPCR convencional, e tem a vantagem de ter menor risco de contaminação cruzada, pois não é necessária a abertura dos tubos para adição de reagentes, já que a técnica utiliza oligonucleotídeos internos (em relação à posição de anelamento do primeiro par de oligonucleotídeos utilizado) imobilizados na tampa do microtubo (Figura 4). Ao final da primeira reação, o produto amplificado entra em contato com os oligonucleotídeos fixados na tampa, através da rotação desses tubos, que são levados novamente ao termociclador para dar início à segunda reação. O *amplicon* gerado na segunda reação é interno ao primeiro e obrigatoriamente menor. A STNPCR é capaz de detectar uma cópia do DNA alvo a partir de uma única célula bacteriana (ABATH et al., 2002; LIMA et al., 2009, 2015).

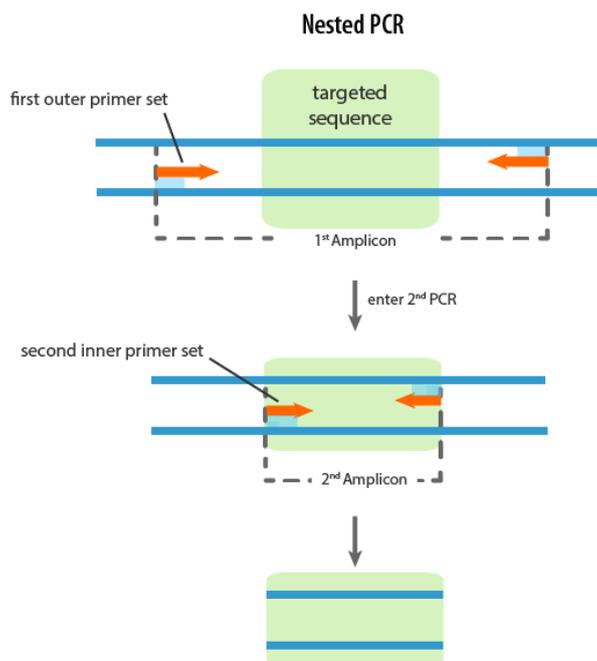
Para o diagnóstico da TB, a STNPCR é de grande utilidade para auxiliar no diagnóstico da doença. Os alvos mais comumente utilizados pelas técnicas de PCR para

identificação das micobactérias são o *IS6110* e o 16S rDNA (ROZALES, 2013; ROZALES et al., 2014).

O *IS6110* é uma sequência de inserção específica do complexo *Mtb*, estando presente em seu genoma em diferentes números de cópias (variando de 10 a 16 cópias) e integrado em vários sítios cromossômicos. Esta sequência de inserção possui 1.350 pb e é muito usada como marcador molecular do complexo *Mtb* para o diagnóstico da TB, sendo possível identificar a presença da bactéria em amostras biológicas. O *IS6110* é um dos elementos repetitivos mais prevalentes na maioria das cepas de *Mtb*. O uso dessa sequência também tem sido frequente em estudos moleculares de base epidemiológica devido ao alto grau de discriminação que se obtém com essa sequência (ASSIS, 2007; GALAGAN, 2014; ROYCHOWDHURY et al., 2015).

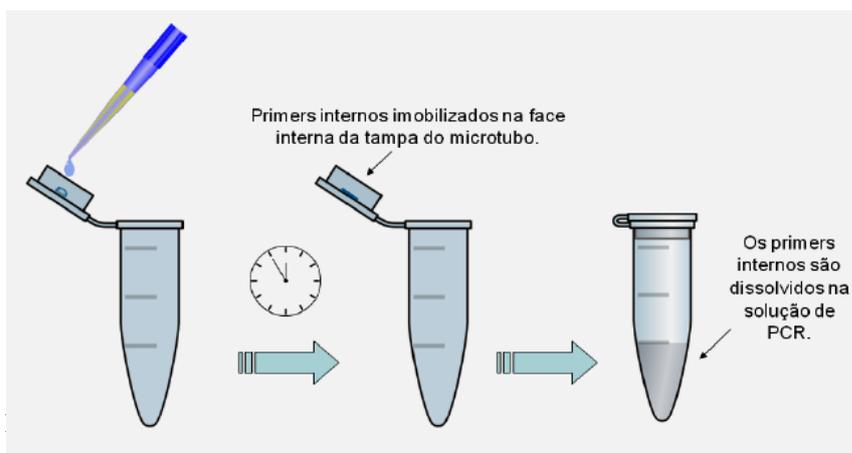
A sensibilidade e a especificidade da NPCR e STNPCR variam de acordo com o tipo de amostra biológica analisada e com a forma clínica da TB (pulmonar ou extrapulmonar). A presença de inibidores e contaminantes nas amostras, bem como o tipo de extração de DNA realizada, podem influenciar no desempenho dos testes (DUBEY et al, 2013; GHOLOOBI et al, 2014). Alguns estudos mostram a utilização de amostras extrapulmonares, especialmente sangue e urina, para o diagnóstico da TB pulmonar e extrapulmonar (CRUZ et al., 2011; SALAZAR, 2012; GUARINES, 2015; LIMA et al., 2015).

Figura 3 - Esquema representativo do princípio da Nested PCR



Fonte: PCR (2017)

Figura 4 - Representação da fixação dos *primers* internos da STNPCR na tampa do microtubo.



Fonte: Silva (2012)

2.7.5.2 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Outra variação da PCR convencional é a qPCR, que vem sendo bastante utilizada como auxiliar no diagnóstico de várias doenças infecciosas, inclusive a TB. A técnica amplifica uma sequência de DNA alvo e faz a detecção dessa amplificação no mesmo momento, através da emissão de uma fluorescência. As fases de amplificação, detecção e quantificação ocorrem simultaneamente e em tempo real. A análise da emissão é feita por um detector da luz emitida e por um amplificador de sinal, que vão traçando um gráfico a cada ciclo. A intensidade da fluorescência é proporcional à concentração dos produtos de PCR amplificados. Os fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz num comprimento de onda específico (GUARINES, 2015; LIRA, 2012; OLIVEIRA, 2010; RAMOS, 2012; ROZALES, 2013; ROZALES et al., 2014).

A PCR apresenta três fases que são características: as fases exponencial, linear e estacionária. A qPCR apresenta elevada sensibilidade e especificidade, além de ser uma técnica altamente precisa, uma vez que determina seus valores na fase exponencial da reação, sendo essa fase a que tem maior eficiência, e portanto é considerada a melhor fase para se estudar a reação (OLIVEIRA, 2010; SANTOS, 2012).

Os sistemas de detecção variam e podem ser agrupados de duas maneiras diferentes: por corantes intercalantes e por sondas de sequência específica. Os corantes intercalantes não se ligam a uma sequência específica de DNA. Eles se intercalam na dupla hélice do DNA, permitindo que sejam detectados. Entretanto, o desenho correto dos *primers* confere

especificidade à reação. Dentre os corantes, o mais utilizado é o SYBR Green® (LIRA, 2012; OLIVEIRA, 2010; SANTOS, 2012). As sondas se ligam especificamente a uma região interna da sequência que se deseja amplificar. Elas são compostas por duas moléculas fluorescentes ligadas em suas extremidades, uma na extremidade 5' (denominada *reporter*) e uma na extremidade 3' (denominada *quencher*). Estas duas moléculas, quando separadas pela ação exonucleásica da *Taq* DNA-polimerase durante a extensão da fita de DNA, emitem fluorescência, que é detectada pelo sistema no momento em que está ocorrendo a amplificação. As sondas mais utilizadas são as sondas de hidrólise (TaqMan®) e os *molecular beacons* (grampos moleculares). A TaqMan®, após a ação da *Taq* DNA-polimerase, é destruída, sendo que novas sondas são consumidas a cada ciclo de amplificação. Já os *molecular beacons* se soltam do DNA alvo e voltam a sua conformação inicial, voltando a atuar nos ciclos seguintes (NASCIMENTO et al., 2010; PINHATA, 2014; SANTOS, 2012).

2.7.5.3 Gene Xpert® MTB/RIF

O gene *Xpert*® *MTB/RIF* (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) é uma tecnologia automatizada, baseada em PCR em tempo real, que detecta ao mesmo tempo o *Mtb* e a resistência à rifampicina. O processamento e a análise da amostra são feitos em um único equipamento, e o resultado é obtido com menos de duas horas (AGRAWAL et al., 2016; CAMARGO et al., 2015; PIATEK et al., 2013). Esta tecnologia utiliza um sistema de cartuchos que contém todos os reagentes necessários para o processamento das amostras: extração do DNA, amplificação e detecção do DNA amplificado (CAMARGO et al., 2015; STEINGART et al., 2014).

O gene *Xpert*® *MTB/RIF* utiliza o sistema de *molecular beacons*, que são sequências de oligonucleotídeos que contém uma sonda específica inserida entre as extremidades da sequência. São utilizadas cinco diferentes sondas numa reação multiplex. Cada sonda é complementar a uma região alvo diferente dentro do gene *rpoB* do *Mtb*, determinante da resistência à rifampicina, que contém 81pb. A amplificação do DNA alvo acontece através de uma heminested-PCR e a detecção acontece em tempo real. O ensaio também contém esporos de *Bacillus globigii* liofilizados, que servem como controle interno da reação. A interpretação do resultado acontece da seguinte maneira: quando a sonda se liga à sequência alvo, emite fluorescência, o que significa que uma das sequências do gene é susceptível à rifampicina. Se

a sonda não se liga ao DNA alvo, ou se essa ligação ocorrer tardiamente, a amostra é considerada resistente à rifampicina (BLAKEMORE et al., 2010; LAWN; NICOL, 2011).

Com esta tecnologia, amostras de escarro são analisadas com o mínimo de processamento. As amostras são tratadas com hidróxido de sódio (NaOH) e isopropanol, e incubadas durante 15 minutos, visando reduzir a viabilidade do bacilo e diminuir o risco biológico. Após esta etapa, as amostras são transferidas para o cartucho, e a partir daí o processamento é feito de forma automatizada (LAWN; NICOL, 2011). Os resultados em amostras de escarro são positivos em 99-100% dos pacientes com baciloscopia positiva, e em 57-83% dos pacientes com baciloscopia negativa. Inicialmente, o *gene Xpert® MTB/RIF* foi desenvolvido e otimizado para diagnosticar a TB pulmonar através de amostras de escarro. Mais recentemente, vários estudos vêm sendo desenvolvidos em amostras extrapulmonares (LAWN; ZUMLA, 2012; SINGH et al., 2016; TAYLOR et al., 2012; THERON et al., 2014;). Entretanto, comparando com o TB pulmonar, a investigação da TB extrapulmonar é mais complexa, devido à variedade de amostras clínicas e a dificuldade de se obter amostras adequadas para o processamento. A sensibilidade da técnica em amostras extrapulmonares é bastante variada, com valores de 25% a 95%, dependendo da população estudada, do tipo de TBEP, da qualidade e quantidade de bacilos nas amostras clínicas bem como do padrão ouro utilizado (LAWN; ZUMLA, 2012).

Desde 2010, a OMS recomenda o uso do *gene Xpert® MTB/RIF* para o diagnóstico da TB pulmonar, e em 2013, passou a recomendar seu uso para diagnosticar a TB em crianças e em formas específicas de TB extrapulmonar. É o único teste molecular recomendado pela OMS, e tem melhor acurácia do que a baciloscopia. O Brasil está entre os países com alta carga de TB. Assim, o Ministério da Saúde recomendou o uso do *gene Xpert® MTB/RIF* para o diagnóstico da TB pulmonar nos serviços públicos de saúde, como uma forma de aumentar o número de casos notificados (DUROVNI; SARACENI; CORDEIRO-SANTOS; et al., 2014). Um estudo piloto para a implementação do *gene Xpert® MTB/RIF* foi realizado em duas capitais com alta carga da doença, Rio de Janeiro e Manaus. Os resultados mostraram um aumento na confirmação do diagnóstico e uma redução no tempo para o início do tratamento (DUROVNI; SARACENI; HOF, VAN DEN; et al., 2014; PINTO et al., 2016).

Entretanto, seu uso se torna limitado para implantação na rotina laboratorial de países com poucos recursos, visto que o custo é elevado para a aquisição e manutenção do equipamento. Outra desvantagem é que o equipamento precisa de uma fonte de energia ininterrupta e um computador acoplado para a análise dos dados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016; PIATEK et al., 2013).

2.8 Métodos de detecção dos produtos amplificados da PCR

2.8.1 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese é uma técnica simples, cujo princípio é a separação de moléculas carregadas, como ácidos nucleicos e proteínas, através da aplicação de um campo elétrico (OLIVEIRA et al., 2015). Os ácidos nucleicos são moléculas naturalmente carregadas devido à presença de grupos fosfatos. Possuem carga negativa e quando submetidas a um campo elétrico, migram em direção ao polo positivo. Um dos métodos mais utilizados para a separação de ácidos nucleicos é a eletroforese em gel, que pode ser de agarose ou poliacrilamida (PINHATI, 2015).

A técnica de eletroforese em gel de agarose tem como base a separação das moléculas de acordo com o seu tamanho. Moléculas maiores demoram mais tempo para passar pelos poros formados pelo gel e as menores passam mais rapidamente. Não é apenas o tamanho da molécula que determina sua migração. Outros fatores estão envolvidos: a concentração da agarose, a voltagem aplicada, o tipo de agarose, a conformação do DNA e o tampão utilizado (LEE et al., 2012). A visualização é feita de uma forma indireta, utilizando um composto que se intercala na dupla fita de DNA, o brometo de etídio ou *Blue Green*, que emite uma fluorescência quando submetido à luz ultravioleta (ROSSETTI et al., 2006). Com este método pode-se detectar uma quantidade igual ou maior que 10ng de DNA, e a intensidade de fluorescência emitida é proporcional à concentração de DNA presente na amostra (CORRÊA; POSSIK, 2013). Uma das desvantagens do uso do gel de agarose em laboratórios de rotina é o seu alto custo (PINHATI, 2015).

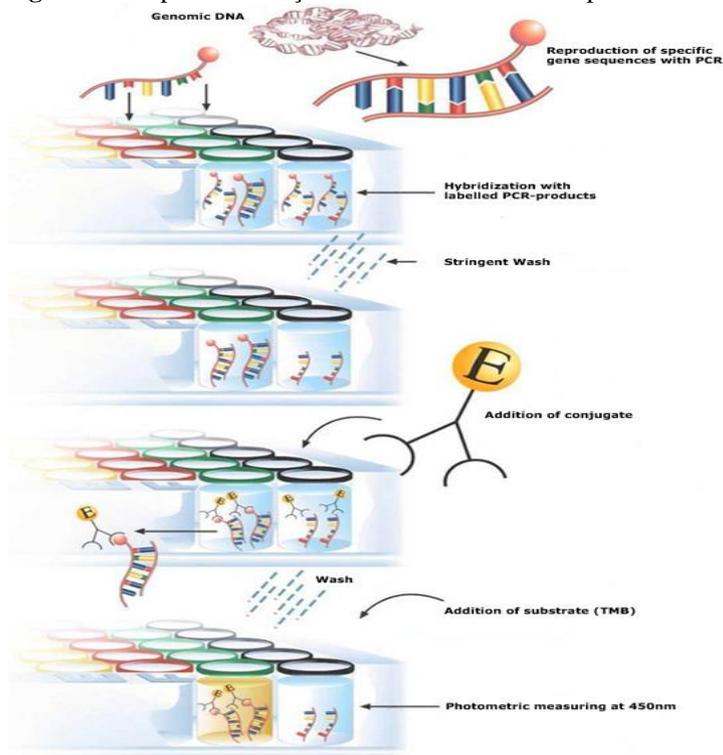
2.8.2 Detecção colorimétrica

A detecção colorimétrica, ou PCR ELISA, é uma técnica que combina os dois métodos, PCR e ELISA, numa única análise. É um método enzimático, que permite quantificar o produto gerado na PCR após a imobilização de DNA biotinilado na placa (SUE et al., 2014). A técnica se baseia na propriedade de complementariedade das bases nitrogenadas e envolve três passos: amplificação, imobilização e detecção. Na primeira etapa o alvo de interesse é submetido à PCR. Na sua porção 5', um dos primers é conjugado à uma molécula de biotina. A biotina é uma molécula de vitamina facilmente modificada para que

possa se ligar quimicamente a proteínas e outras moléculas biológicas (THERMO SCIENTIFIC, 2010). Na etapa de imobilização, o produto amplificado ao fim da reação de PCR se liga especificamente a uma sonda, imobilizada nos poços da placa. Nesta etapa, ocorre a adição da streptoavidina, que é uma proteína tetramérica que se liga à biotina com alta afinidade, ligando-se somente ao produto de PCR com o alvo específico, sendo as outras ligações inespecíficas removidas através de sucessivas lavagens. A etapa de detecção consiste na adição de um substrato, que reage com o complexo biotina-streptoavidina peroxidase formando uma coloração, lida em leitor de ELISA através de densidade ótica. A coloração é proporcional à quantidade de DNA alvo que se liga com a sonda (Figura 5) (LCP RESEARCH GROUP, 2014; ROSSETTI et al., 2006; SUE et al., 2014).

Quando comparada à eletroforese em gel de agarose, a detecção colorimétrica tem as vantagens de ser uma técnica com interpretação objetiva (possui definição de *cut off*), é um método rápido e podem ser analisadas grandes quantidades de amostras clínicas de uma só vez. Tem baixo índice de contaminação e utiliza equipamentos já disponíveis em laboratórios de rotina (leitor de ELISA e lavadora de placas), o que diminui seu custo (CARDOSO, 2013).

Figura 5 - Etapas da detecção colorimétrica em microplacas de titulação.



Fonte: Hyplex (2006)

2.9 Controle, prevenção e tratamento

A TB se configura como um problema de saúde pública e requer um esforço por parte das políticas públicas e da sociedade para mudar os seus padrões endêmicos. A partir da declaração sobre a TB ser uma emergência mundial, em 1993, a OMS passou a recomendar a estratégia *Directly observed treatment, short-course* (DOTS) como resposta global para o seu controle. A estratégia DOTS preconiza a disponibilização de medicamentos regularmente, um sistema de registro dos casos e que a TB esteja entre as prioridades das políticas públicas de saúde (MITANO et al., 2017). O tratamento diretamente observado (TDO) consiste na observação da ingestão do medicamento por parte de um profissional de saúde treinado. No Brasil, o DOTS foi implantado em 1998, dando prioridade às cidades com alta carga da doença. Observaram-se, após sua implantação, uma queda na taxa de abandono, no coeficiente de incidência e acesso aos medicamentos garantido (IBANÊS; JUNIOR, 2013; SOUZA et al., 2016).

Em 2014, a OMS lançou um plano conhecido como *END-TB Strategy*, visando atingir metas após o ano de 2015. O objetivo é reduzir em 95% a mortalidade e diminuir em 90% a incidência da TB até 2035 (SCHITO et al., 2016; UPLEKAR et al., 2015). Este plano tem como base três pilares: cuidados e prevenção integrados centrados no paciente; políticas arrojadas e sistemas de apoio; e intensificação da pesquisa e inovação (UPLEKAR et al., 2015).

No âmbito individual, duas medidas são importantes para prevenção da TB: a vacinação e a quimioprofilaxia. A vacinação é a medida central para proteger as pessoas não infectadas de adoecerem caso venham a se infectar pelo bacilo. No Brasil, a vacina BCG (*bacille Calmette-Guérin*) é preparada com cepas atenuadas de *M. bovis*, e protege contra as formas mais graves da doença em crianças, com eficácia de cerca de 75% contra as formas miliar e meníngea. A vacina é indicada para crianças entre 0 e 4 anos, sendo obrigatória em crianças menores de 1 ano. A quimioprofilaxia é indicada para pacientes portadores da TB latente. O fármaco de escolha, neste caso, é a isoniazida, que reduz de 60 a 90% o risco de adoecimento. Antes de iniciar o tratamento, é importante afastar a possibilidade de TB ativa, através de exames clínicos e radiológicos (BRASIL, 2014).

Novas vacinas vêm sendo estudadas e desenvolvidas para promover melhor proteção do que a BCG. As vacinas são divididas em duas categorias: as vacinas com a micobactéria viva e as vacinas de subunidade. Entretanto, as vacinas não demonstraram a capacidade de

prevenir e erradicar a infecção em modelos animais ou humanos, requerendo ainda mais estudos (TANG et al., 2016).

A TB é uma doença que tem cura desde que os princípios básicos do esquema medicamentoso sejam obedecidos, ou seja, o paciente precisa tomar as doses corretas e por tempo suficiente. O esquema terapêutico básico atualmente utilizado envolve os seguintes fármacos: isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z) e etambutol (E). Para adultos e crianças maiores de 10 anos, são administrados comprimidos em doses fixas combinadas (RHZE e RH) (BRASIL, 2014).

Nos dois primeiros meses é administrado o Coxcip 4, que é a combinação dos quatro fármacos, e nos últimos quatro meses se utiliza a rifampicina e a isoniazida. Para crianças menores de 10 anos, o etambutol não é indicado. O esquema básico é indicado para todos os casos novos, tanto para TB pulmonar como extrapulmonar (exceto para a forma meningoencefálica), infectados ou não pelo HIV. Para o tratamento da forma meningoencefálica, deve ser administrado em associação com o esquema anti-TB um corticosteroide (BRASIL, 2009b, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

A confirmação da TB muitas vezes torna-se difícil, sobretudo nas formas paucibacilares da doença, como os casos de TBEP, TB em crianças e imunodeprimidos, e pacientes com baciloscopia negativa. Nesses casos, os exames de imagens e histopatológicos são, geralmente, inespecíficos e existem limitações nos testes convencionais de diagnóstico. Estas dificuldades têm levado à busca de novos métodos de diagnóstico auxiliares na identificação do bacilo. O diagnóstico correto e rápido da TB e o início imediato do tratamento específico influenciam na redução da transmissão da doença, nos casos pulmonares, bem como na redução da mortalidade, especialmente entre os casos mais graves, como nos imunodeprimidos (SCHERER et al., 2011; LUO; BANAEI, 2013).

O diagnóstico laboratorial convencional, que engloba as técnicas de baciloscopia e cultura, possui limitações na detecção da TB. Embora a baciloscopia seja uma técnica rápida e de fácil execução, sua sensibilidade é baixa. A cultura, mais sensível que a baciloscopia, é um método demorado, necessitando de 2 até 8 semanas para sua interpretação (FERRI et al., 2014; RYU, 2015). As técnicas moleculares, sobretudo a PCR, vêm sendo propostas como auxiliares no diagnóstico da TB. Comparadas aos métodos convencionais, são mais rápidas, têm alta sensibilidade e especificidade (ANOCHIE et al., 2012). A STNPCR permite a identificação do *M. tuberculosis* diretamente de amostras clínicas, e tem a vantagem de aumentar a sensibilidade da técnica, pois consiste de duas reações de PCR subsequentes (MEHTA et al., 2012; LIMA et al., 2015).

A junção da STNPCR com a técnica de detecção colorimétrica oferece um sistema molecular rápido, de fácil execução e interpretação para a detecção do *M. tuberculosis* em amostras biológicas. A interpretação é feita de maneira objetiva, através de um *cut off*, e a técnica colorimétrica é realizada em equipamentos presentes nos laboratórios de rotina (lavadoras e leitores de ELISA), sem a necessidade de profissionais especializados, facilitando a implantação do sistema em laboratórios clínicos (CARDOSO, 2013; SUE et al., 2014).

Este projeto visa avaliar a STNPCR colorimétrica automatizada na detecção do DNA do complexo *M. tuberculosis* utilizando amostras de sangue, urina, escarro e líquido pleural de pacientes com TB. Também tem como objetivo propor um sistema diagnóstico mais rápido, sensível e específico da doença, sobretudo nos casos difíceis de serem elucidados pelos exames convencionais, promovendo assim, uma redução dos coeficientes de prevalência e incidência da TB, especialmente em regiões endêmicas, como o Estado de Pernambuco.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual o desempenho da STNPCR com detecção colorimétrica automatizada para a detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em diferentes amostras biológicas?

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Definir os parâmetros laboratoriais da técnica de STNPCR com detecção colorimétrica automatizada em diferentes amostras biológicas de pacientes com tuberculose.

5.2 Específicos

a) Estabelecer o protocolo técnico do ensaio enzimático da STNPCR colorimétrica automatizada para a detecção sensível e específica do complexo *M. tuberculosis*.

b) Determinar o *cut off* do ensaio colorimétrico automatizado nas amostras clínicas coletadas de pacientes com tuberculose comprovada laboratorialmente.

c) Avaliar o limite de detecção de DNA do *M. tuberculosis* através da STNPCR colorimétrica automatizada em amostras clínicas de sangue, urina, escarro e líquido pleural.

d) Analisar o desempenho da STNPCR colorimétrica automatizada nos diferentes tipos de amostras biológicas coletadas de pacientes com tuberculose.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Informações sobre o estudo

Trata-se de um estudo analítico de acurácia para definição de parâmetros técnicos/laboratoriais de um teste diagnóstico molecular para a tuberculose.

6.1.1 Local de estudo e seleção das amostras

Este estudo foi realizado no Laboratório de Imunoepidemiologia (LIE) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM)/FIOCRUZ. Foram selecionadas amostras clínicas de sangue, urina, escarro e líquido pleural de pacientes com diagnóstico final de tuberculose, independente da forma clínica (pulmonar ou extrapulmonar), de ambos os sexos e faixa etária variada, provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC – UFPE), do Hospital Barão de Lucena (HBL), do Hospital Otávio de Freitas (HOF), do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) e do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), integrantes da rede SUS de saúde. Para os controles negativos foram selecionados pacientes que inicialmente entraram como casos suspeitos de TB, mas que tiveram o diagnóstico final “não TB”. O diagnóstico final de TB foi realizado pelo médico acompanhante do serviço público de saúde, de acordo com os critérios clínicos, epidemiológicos, exames laboratoriais, cultura e/ou histopatológico compatível e resposta terapêutica específica seguindo os critérios da Sociedade Torácica Americana e III Diretriz para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1999; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2009).

6.1.2 Definição das pacientes

a) Pacientes com tuberculose: Pacientes com evidência clínica e/ou epidemiológica de TB, e isolamento do *M. tuberculosis* em amostra clínica através de exame direto ou cultura, ou exame histopatológico, ou resposta ao tratamento específico.

b) Pacientes sem tuberculose: Pacientes sem TB, com quadro clínico e laboratorial não compatível com a doença e diagnóstico molecular por PCR negativo.

6.1.3 Critérios de inclusão

Amostras clínicas de sangue, urina, escarro e líquido pleural de pacientes de ambos os sexos, com diagnóstico final de TB (pulmonar ou extrapulmonar) e sem TB (controles negativos), que concordaram em participar da pesquisa através da compreensão e assinatura do termo de consentimento e assentimento livre e esclarecido.

6.1.4 Critérios de exclusão

- a) Pacientes cujo tratamento para TB já tivesse sido iniciado;
- b) Pacientes cujos dados clínicos e laboratoriais foram insuficientes para a definição do diagnóstico final;
- c) Pacientes com história de tratamento anterior para TB há menos de um ano.

6.1.5 Critérios de Perda

- a) Pacientes cujas amostras biológicas coletadas foram insuficientes para o processamento no laboratório;
- b) Pacientes que tiveram a cultura contaminada.

6.1.6 Cálculo Amostral

Foi utilizada uma amostra de conveniência, de pacientes com suspeita inicial de TB, que chegaram ao nosso laboratório por demanda espontânea, de acordo com os critérios acima citados.

6.1.7 Considerações éticas

Todos os pacientes foram esclarecidos sobre a pesquisa e convidados a participar como membro voluntário, assinando um termo de livre consentimento referente à sua participação na pesquisa. Caso o paciente fosse incapacitado de emitir sua opinião, o responsável pelo mesmo assinou o termo. Os pacientes menores de idade assinaram um termo de assentimento livre e esclarecido, com o consentimento dos pais ou responsáveis. Como benefícios ao

paciente, o estudo poderá contribuir em um futuro próximo para o diagnóstico e tratamento mais rápido da doença. Este projeto encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Aggeu Magalhães, cujo registro no CAEE é 45687215.2.0000.5190 (Anexo A).

6.1.8 Armazenamento e análise dos dados

Cada paciente respondeu a um questionário clínico-epidemiológico desenvolvido e padronizado pela equipe de pesquisadores do LIE. Os dados foram armazenados no IBM SPSS Statistics v. 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Os programas utilizados para análise estatística dos dados (obtenção da curva ROC e índice Kappa) foram o OpenEpi (versão 3.01 - http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm), o IBM SPSS Statistics (v. 20.0) e o MedCalc. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

6.2 Métodos de coleta e processamento das amostras

Foram coletadas de todos os pacientes que participaram desta pesquisa, amostras de sangue e urina. Quando possível ou quando solicitado pelo médico acompanhante, amostras de escarro e líquido pleural também foram coletadas. Estas coletas foram realizadas pelo próprio médico assistente da unidade de saúde, que providenciou o encaminhamento ao LIE para serem processadas. No LIE, as técnicas de descontaminação e extração do DNA foram processadas por técnicos e estudantes treinados e capacitados. A STNPCR colorimétrica automatizada foi realizada pelo responsável desta pesquisa e repetida sempre que o resultado se mostrou negativo ou indeterminado.

6.2.1 Sangue

Foram coletados 4,5 ml de sangue de cada paciente por punção venosa usando tubos (Vacutainer®, Becton and Dickson, England) contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid* – EDTA).

Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cell* – PBMC): Após a coleta, o sangue foi processado através da separação dos elementos do sangue (plasma, PBMC e hemácias) com Ficoll, e utilizamos plasma e PBMC para o processo de extração de DNA.

6.2.2 Urina

Foram coletados 10,0mL de urina em tubo seco estéril de cada paciente, sendo três amostras de urina em dias consecutivos (1ª urina da manhã). A descontaminação foi realizada seguindo o protocolo do Método de Petroff modificado (NaOH 4%) (BRASIL, 2008).

6.2.3 Escarro

Foi coletado através de eliminação espontânea (1 a 5 ml), em tubo seco rosqueado e estéril, em uma única amostra com o paciente em jejum, ao acordar. A descontaminação foi realizada seguindo o protocolo do Método de Petroff modificado (NaOH 4%) (BRASIL, 2008).

6.2.4 Líquido Pleural

Foi solicitado e coletado pelo médico assistente do serviço de saúde, de acordo com o protocolo de coleta de cada serviço de saúde. Foram coletados em uma única amostra, em tubo seco e estéril, armazenados em geladeira até o processo de extração de DNA.

6.2.5 Cultura e identificação de micobactérias em meio Löwestein-Jensen

A técnica de cultura e identificação de micobactérias foi realizada por um técnico do laboratório de Imunoepidemiologia, segundo o Manual Nacional de Vigilância da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008).

6.2.6 Extração de DNA

O DNA das amostras foi extraído utilizando o kit de extração Qiagen Mini Prep Kit, seguindo protocolo do fabricante. O processo seguiu o seguinte roteiro: pipetou-se 20µl de proteinase k em um tubo de eppendorf de 1,5ml. Em seguida foram adicionados 200µl da amostra biológica, depois mais 200µl do tampão de lise (*Buffer AL*), e cada tubo foi agitado no vórtex por 15 segundos. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 56°C por 10 minutos, e então centrifugados a 16,2 x g por 1 minuto, para retirar as bolhas que se

formaram. Depois, foram adicionados 200µl de etanol a uma concentração de 96-100%, e os tubos foram centrifugados mais uma vez a 16,2 x g por 1 minuto. Após a conclusão desta etapa, a mistura foi transferida para o QiAmp Mini Spincolumn, sem molhar a parede da coluna, centrifugada a 6,2 x g por um 1 minuto, e logo em seguida, a coluna foi colocada em um novo tubo coletor, e o coletor contendo o filtrado foi descartado. Adicionou-se então, na coluna, 500µl do tampão de lavagem (*Buffer AW1*), a amostra foi centrifugada a 6,2 x g por 1 minuto, e mais uma vez, o coletor contendo o filtrado foi desprezado, e um novo tubo coletor acoplado à coluna. Em seguida, foram adicionados 500µl do tampão de lavagem (*Buffer AW2*), a amostra foi centrifugada por 17 x g por 3 minutos. Novamente, o tubo coletor com o filtrado foi descartado, e um novo tubo coletor acoplado à coluna. A amostra foi submetida mais uma vez à centrifugação, a 17 x g por 1 minuto. Por fim, a coluna foi colocada em um novo tubo tipo microtubo “eppendorf” de 1,5ml, o tubo coletor com o filtrado foi descartado, e adicionou-se na coluna 200µl do tampão de eluição (*Buffer AE*). A amostra ficou em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente, e então foi centrifugada a 6,2 x g por 1 minuto, concluindo a extração do DNA.

Para todas as amostras processadas foi feito um controle negativo seguindo o mesmo protocolo do fabricante, colocando-se tampão TE ou água destilada no lugar da amostra biológica.

6.2.7 Visualização dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose

Os *amplicons* gerados ao fim da STNPCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com Blue Green Loading Dye (LCG) e visualizados sob luz ultravioleta. O marcador de peso molecular utilizado foi o Low Mass Ladder (Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia, EUA).

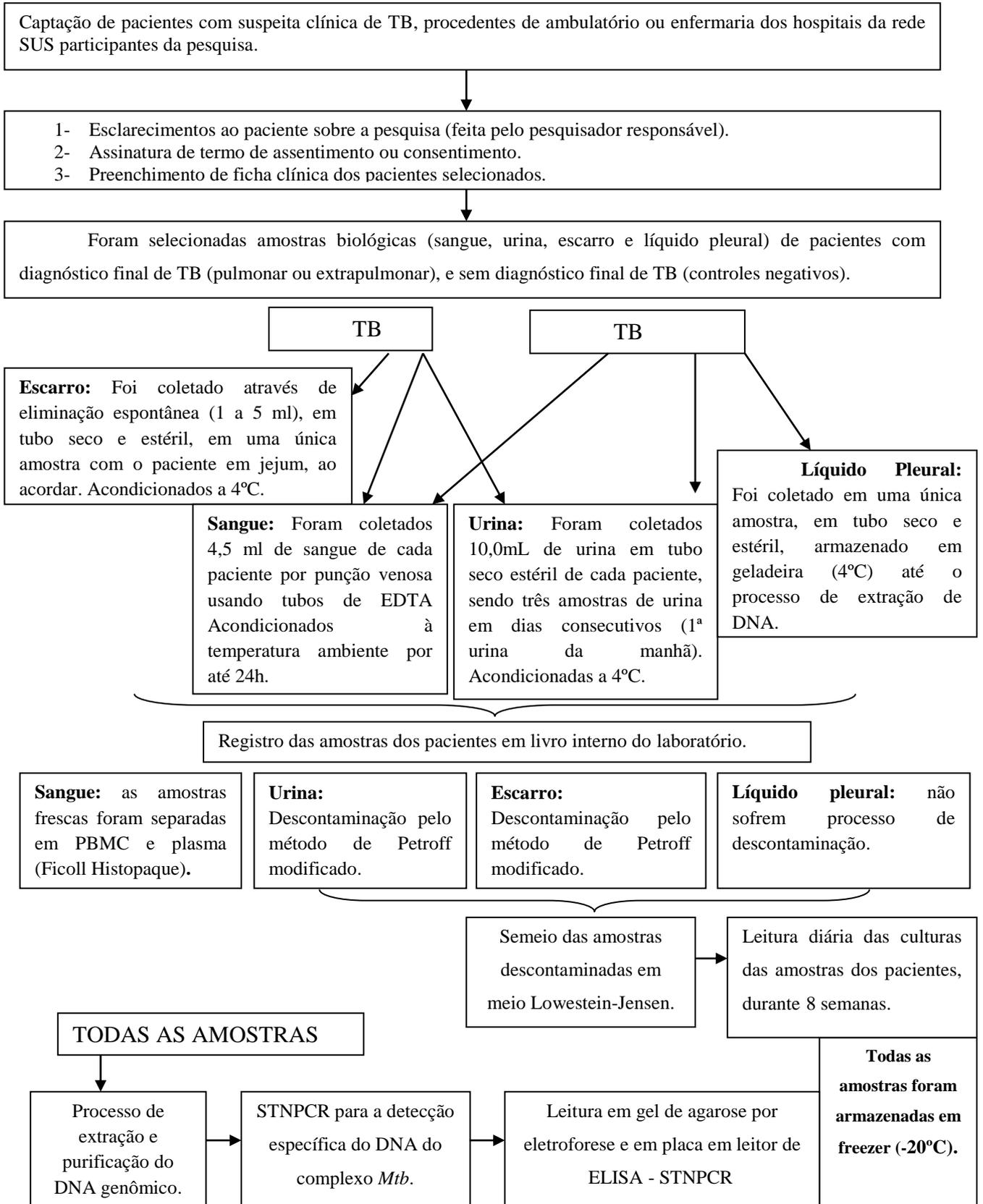
6.2.8 Armazenamento do material biológico

Depois de realizados os procedimentos e protocolos técnicos para o estudo, as amostras biológicas foram armazenadas em biorrepositório, no LIE, do Instituto Aggeu Magalhães, em freezer (apenas para armazenamento de amostra biológica) a temperatura de -20°C, onde foram armazenadas e separadas em caixas de polipropileno de armazenamento de amostras (amostras *in natura* ou descontaminadas e produtos da extração do DNA). Cada

microtubo contendo as amostras ou o produto de extração do DNA foi devidamente etiquetado com o número de registro do paciente no LIE e o nome da amostra biológica. Havendo necessidade de utilização das amostras em um estudo posterior, um novo consentimento será solicitado ao sujeito da pesquisa (PADILHA, 2011).

A coleta e processamento das amostras biológicas podem ser resumidos em um fluxograma, como mostra a figura 6.

Figura 6 - Fluxograma de seleção de pacientes, coleta e processamento das amostras biológicas.



6.3 Desenvolvimento das etapas da STNPCR colorimétrica automatizada

6.3.1 Condições da Nested PCR em único tubo (STNPCR)

A sequência de inserção *IS6110* foi o alvo escolhido para a STNPCR, por ser específico para o complexo *M. tuberculosis*. Os oligonucleotídeos externos utilizados foram o TJ5 (5' - CCG CAA AGT GTG GCT AAC - 3') e o TJ3 (5' - ATC CCC TAT CCG TAT GGT G - 3'), que amplificam um fragmento de 409pb; e os oligonucleotídeos internos utilizados foram o OLI5 (5' - AAC GGC TGA TGA CCA AAC - 3') e o STAN3 (5' - GTC GAG TAC GCC TTC TTG TT - 3'), amplificando um fragmento de 316pb (LIMA, 2009). Na porção terminal 5' do OLI-5, foi adicionada uma molécula de biotina.

A reação de amplificação foi realizada em um termociclador automático (Eppendorf Gradiente). A primeira reação consistiu em 15 ciclos (94°C - 1 min; 57°C - 1 min e 72°C - 1 min). Os oligonucleotídeos externos (TJ3 e TJ5) foram utilizados numa concentração de 0,5 pmols/ μ l, em um volume final de 50 μ l contendo Tris-HCl a 200mM, com pH=8.4; KCl 500mM (Tampão 10x); MgCl₂ a 2,5mM; dNTP 2mM x 5 μ l; e 5U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen). Os oligonucleotídeos internos (STAN3 e OLI5-biotinilado) foram utilizados na concentração de 50 pmols/ μ l, e participaram da segunda etapa da PCR, com duração de 45 ciclos (94°C - 1min; 63°C - 1min e 72°C - 1min).

Os oligonucleotídeos internos foram fixados na superfície interna da tampa de cada microtubo aberto, numa estufa a 37°C ou temperatura ambiente. Para que fizessem parte da segunda reação, os tubos foram invertidos, após o fim do 15º ciclo, a fim de que fossem eluídos da tampa e fizessem parte da mistura dos reagentes, para iniciar os 45 ciclos seguintes.

Para cada reação da STNPCR foram feitos um controle negativo (10 μ l de TE ou água destilada) e um controle positivo (2 μ l de DNA de cepa de *M. tuberculosis* H37Rv e mais 8 μ l de água milli-Q estéril). Todas as amostras negativas foram repetidas para confirmação do resultado.

6.3.2 Desenho da sonda aminada

A sonda utilizada foi desenhada pelos autores deste trabalho através do programa Primer QuestSM (disponível gratuitamente no site da Integrated DNA Technologies <<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>>) e tem a seguinte sequência: 5'-

TTTTTTTTTTTTGGGTAGCAGACCTCACCTATGTGT- 3', complementar ao DNA alvo amplificado, com uma amina na sua porção terminal 5' (escala de síntese de 50N).

6.3.3 Placa de ELISA utilizada para a realização do ensaio

As placas utilizadas para a realização da técnica foram a Nunc Immobilizer™ Amino e a Immunoplate Maxisorp™ (*Thermo Scientific*), segundo especificações do fabricante.

6.3.4 Etapas de lavagens

As lavagens foram realizadas na lavadora automática Wellwash (*Thermo Scientific*), seguindo o protocolo que segue. Foram utilizados dois tipos de solução: (*saline-sodium citrate* - SSC 2x + Tween 20 a 0,1%), pH 7 e (*phosphate buffered saline* – PBS, com Tween 20 a 0,5% - PBST), pH 7,2.

6.3.5 Protocolo desenvolvido

A técnica de detecção colorimétrica dos produtos amplificados foi otimizada a partir dos protocolos adaptados de Wilson et al (1993), de Michelon et al (2011), de Scherer et AL (2007) e de Verza et al (2009). A detecção automatizada dos *amplicons* da PCR foi realizada por lavadora e incubadora de placas de microtitulação (ELISA).

A detecção colorimétrica consistiu de duas etapas: a fixação da sonda na placa (sensibilização da placa) e a detecção colorimétrica propriamente dita. O primeiro passo para a sensibilização da placa foi a diluição da sonda em tampão carbonato pH 9,6. A sonda foi utilizada numa concentração de 1pmol/μl do tampão. Em seguida, 100μl da solução (sonda à 1pmol/μl + tampão) foram adicionados em cada poço da placa, que foi deixada *over night*, coberta com adesivo, na geladeira (4°C), por 16h-18h, ou guardada em *deep freezer* (-80°C) se fosse necessário usar a placa após 18h.

A sonda foi então aspirada e colocou-se 300 μl da solução de bloqueio (PBS + BSA a 3%), e a placa foi incubada em estufa a 37°C por uma hora. Em seguida, adicionou-se à placa 100μl da solução de hibridização (SSC 20x + Tween 20 a 0,1% + BSA a 0,5%) e 10μl do produto amplificado desnaturado. Os produtos amplificados pela STNPCR foram previamente desnaturados em um termociclador a 100°C, durante 5 minutos, e colocados diretamente no

gelo para evitar a renaturação. Em seguida, a placa foi lacrada e incubada no forno de hibridização por 2h a 66°C. Esse período foi seguido de três lavagens com 300µl da solução de lavagem 2 (SSC 2x + Tween 20 a 0,1%). Após as lavagens, adicionou-se 300µl da mesma solução de lavagem 2, pré-aquecida a 66°C, a placa foi coberta e incubada por 15 minutos no forno de hibridização a 66°. Novamente foram feitas três lavagens com a solução de lavagem 2. Acrescentou-se então 100µl do conjugado estreptoavidina-peroxidase (*Streptavidin-Peroxidase Polymer, Ultrasensitive* – Sigma - Aldrich, Missouri, EUA), na proporção 1:2000 em PBS + Tween 20 a 0,05%. A placa foi coberta e incubada por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foram feitas cinco lavagens com 300µl da solução de lavagem 3 (PBS com Tween 20 a 0,5% - PBST). Na primeira e quinta lavagens, a placa não precisou ficar em repouso. Na segunda e quarta lavagens, a placa ficou descansando por 30 segundos, e na terceira lavagem, ficou em repouso por um minuto. Após as lavagens, foram adicionados 100µl de tetrametilbenzidina (TMB) com peróxido de hidrogênio e a placa foi coberta com papel laminado, ao abrigo da luz, e incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. Por fim, adicionou-se 100µl da solução de parada (H₂SO₄ a 0,1M). A leitura foi feita em leitor de ELISA (*Multiskan FC Thermo Scientific*) no comprimento de onda de 450nm com refiltro em 620nm.

6.3.6 Definição do limite de detecção de DNA do *M. tuberculosis*

Para avaliar e definir o limite de detecção da STNPCR colorimétrica automatizada, foi feita uma curva de diluição de DNA do *M. tuberculosis*, da cepa de referência H37Rv, diluído em água Milli-Q®. A diluição foi feita na proporção de 1:10, variando de 1ng/µL até 10fg/µL.

A curva de diluição nas amostras biológicas (sangue, urina, escarro e líquido pleural) foi feita da seguinte forma: um controle negativo (amostra sabidamente negativa com exames laboratoriais convencionais e moleculares negativos de paciente sem TB) foi submetido ao processo de extração de DNA. A amostra foi então contaminada com DNA da cepa de referência H37Rv do *M. tuberculosis*, de concentração conhecida, anteriormente medida em *nanodrop*. A partir da concentração inicial, foi feita a diluição, na proporção de 1:10, variando de 10ng/µL a 1fg/µL. Nas amostras de sangue, a curva foi feita separadamente em plasma e PBMC. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

6.3.7 Definição do *cut off* para cada amostra clínica

A definição do *cut off* foi realizada pelo programa IBM SPSS Statistics 20.0 e MedCalc, através da obtenção de uma curva ROC (área sobre a curva). A curva foi obtida a partir dos valores das absorbâncias encontrados após a leitura da placa de ELISA. Foram analisadas amostras de indivíduos com diagnóstico final de TB e sem TB.

6.3.8 Avaliação do desempenho da STNPCR colorimétrica automatizada

Para avaliar o desempenho da técnica, calculamos o índice kappa individualmente, para cada amostra clínica, e de uma forma geral, para cada paciente. O índice kappa comparou a detecção colorimétrica com o gel de agarose, em todas as amostras, e a detecção colorimétrica com a cultura e a baciloscopia em amostras de escarro. Foram calculados os respectivos intervalos de confiança para o kappa e o resultado foi interpretado de acordo com o quadro 1 (CARDOSO, 2013; LANDIS; KOCH, 1977).

Quadro 1 - Interpretação do coeficiente de Kappa.

Kappa	Nível de Concordância
<0	Desprezível
0,0 - 0,20	Fraca
0,21 - 0,40	Razoável
0,41 - 0,60	Moderada
0,61 - 0,80	Substancial
0,81 - 1,0	Excelente

Fonte: Adaptada de LANDIS; KOCH, 1977

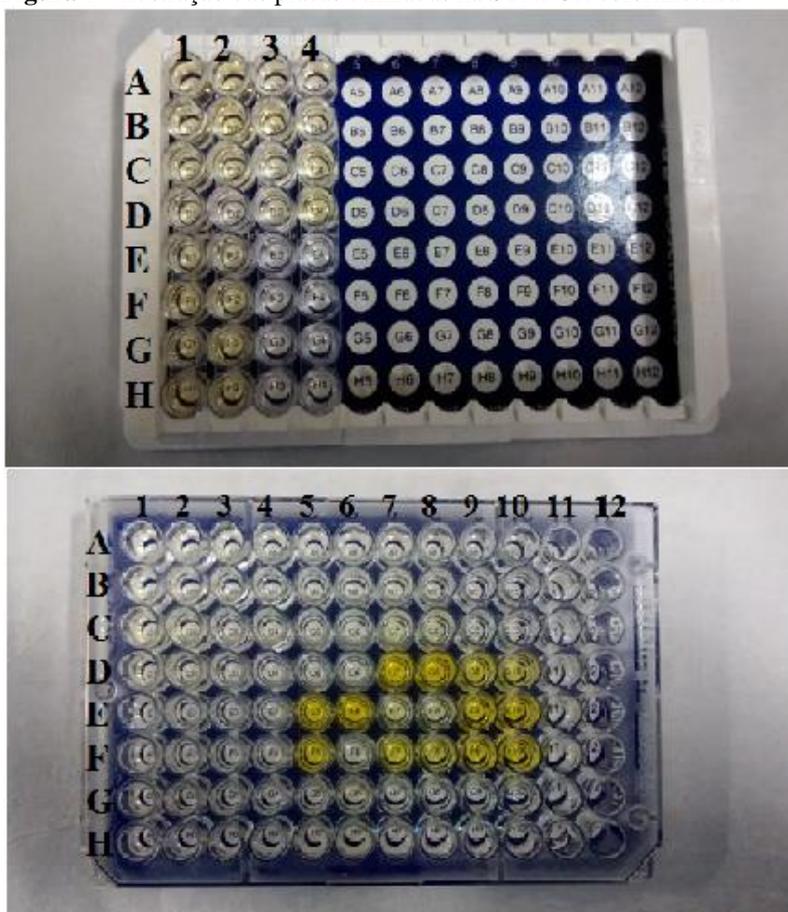
7 RESULTADOS

7.1 Definição dos parâmetros técnicos utilizados na STNPCR colorimétrica

7.1.1. Escolha da placa de microtitulação utilizada

Dois tipos diferentes de placas foram utilizados durante a otimização da técnica: a Nunc Immobilizer™ e a Immunoplate Maxisorp™ (Figura 7). Após testes realizados com as duas placas para avaliar a reprodutibilidade do sistema, a Immunoplate Maxisorp™ foi a escolhida.

Figura 7 - Ilustração das placas utilizadas na STNPCR colorimétrica



Fonte: A autora

Legenda: a) Placa Nunc Immobilizer™; b) Placa Immunoplate Maxisorp™

7.1.2 Definição das etapas de lavagens

As lavagens foram feitas de forma automatizada, através da lavadora de microplacas Wellwash (*Thermo Scientific*). As soluções foram preparadas como disposto em Lima (2015). Entretanto, o protocolo de lavagens sofreu algumas adaptações: a solução de lavagem 1 (SSC 2x + Tween 20 a 0,1%), utilizada após a sensibilização da placa foi retirada do protocolo. Assim, após a sensibilização da placa, segue a etapa de bloqueio. O uso das soluções de lavagem 2 e 3 seguiu o protocolo estabelecido por Lima (2015).

7.1.3 Definição da quantidade de amostra de DNA amplificado utilizada

Foram testadas três quantidades de DNA diferentes, a partir do produto de amplificação da STNPCR: 10 μ L de DNA, 5 μ L de DNA + 5 μ L de água Milli-Q® e 2 μ L de DNA + 8 μ L de água Milli-Q®. A STNPCR colorimétrica automatizada mostrou melhores resultados com as amostras de DNA com 10 μ L.

7.2 Perfil dos pacientes e amostras clínicas

Foram analisados 115 pacientes, com um total de 318 amostras biológicas, sendo 95 amostras de urina, 98 amostras de plasma, 100 de PBMC, 5 de líquido pleural e 20 amostras de escarro. Dos 115 pacientes, 77 (67%) tiveram o diagnóstico final de TB ativa e 38 (33%) foram classificados como “Não TB”. Dos 77 pacientes diagnosticados com TB ativa, 38 apresentaram a forma pulmonar da doença e 39 a forma extrapulmonar. A frequência de casos extrapulmonares está descrita na tabela 1.

Tabela 1 - Frequência de casos extrapulmonares (n=39). (continua).

Forma da TB extrapulmonar	Frequência	%
Ganglionar	7	17,9
Meningoencefálica	2	5,1
Miliar	1	2,6
Óssea	3	7,7
Pleural	8	20,5

Tabela 1 - Frequência das formas extrapulmonares (n=39). (conclusão)

Cutânea	2	5,1
Intestinal	5	12,8
Articular	1	2,6
Sem forma definida*	10	25,6
Total	39	100,0

Fonte: A autora

Nota: *Pacientes cuja forma de TB extrapulmonar não foi definida pelo médico

7.3 Avaliação do limite de detecção de DNA do *M.tuberculosis* através da STNPCR colorimétrica automatizada

7.3.1 Limite de detecção de DNA do *M. tuberculosis* diluído em água Milli-Q®

O limite de detecção da STNPCR colorimétrica automatizada foi determinado pela menor concentração de DNA do *M. tuberculosis* da cepa de referência H37Rv. O resultado obtido mostrou um limite de detecção de 1pg/μL, conforme análise dos valores de absorvância encontrados (Tabela 2) (Figura 8).

Tabela 2 - Médias das leituras de absorvância (450nm e 620nm) do ensaio de detecção colorimétrica na avaliação do DNA extraído de cepa de referência H37Rv em diluições seriadas feitas em água Milli-Q®.

DNA de cepa de referência H37Rv	STNPCR colorimétrica	
	Resultado	Média Absorvância
1ng/μL	Positivo	0,235
100pg/μL	Positivo	0,233
10pg/μL	Positivo	0,188
1pg/μL	Positivo	0,161
100fg/μL	Negativo	0,132
10fg/μL	Negativo	0,128
Controle Negativo	Negativo	0,150
Controle Positivo	Positivo	0,194
Controle Placa*	Negativo	0,155
Branco**	Negativo	0,121

Fonte: A autora

Nota: * Poço sem sonda + Controle positivo da STNPCR.

** Utilizou-se água no lugar da amostra de DNA; Poço sem sonda.

Ao comparar os resultados obtidos através da detecção colorimétrica com os resultados obtidos com o gel de agarose (Figura 9), observa-se um grau de concordância entre

as amostras positivas e negativas. O mesmo limite de detecção ($1\text{pg}/\mu\text{L}$) foi observado na análise feita em gel de agarose.

Figura 8 – Experimento com a curva de DNA em água Milli-Q®.

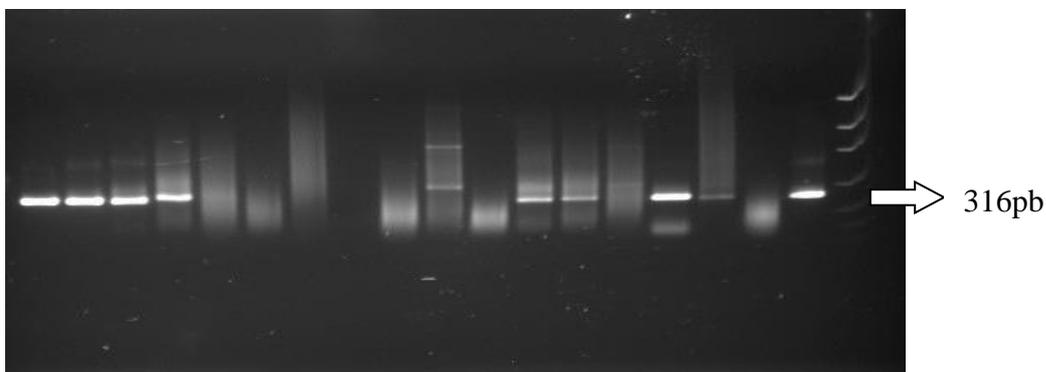
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1ng/ μL	0,786 Cal_0001 1/2	0,624 Cal_0001 2/2	0,126 178/16 Plas_0	0,150 Ctrl - PCR_00	0,083 Ctrl - PCR_00							
100pg/ μL	0,671 Cal_0002 1/2	0,625 Cal_0002 2/2	0,097 178/16 Leuco	0,606 Ctrl + PCR_00	0,615 Ctrl + PCR_00							
10pg/ μL	0,518 Cal_0003 1/2	0,478 Cal_0003 2/2	0,068 178/16 Uri_00	0,059 C- sem sonda	0,151 C- sem sonda							
1pg/ μL	0,248 Cal_0004 1/2	0,106 Cal_0004 2/2	0,249 178/16 Esc_0	0,068 C+ sem sonda	0,069 C+ sem sonda							
	0,064 Cal_0005 1/2	0,064 Cal_0005 2/2	0,190 196/16 Plas_0	0,054 Blank_TB 1/2	0,071 Blank_TB 2/2							
	0,063 Cal_0006 1/2	0,065 Cal_0006 2/2	0,124 196/16 Leuco									
	0,103 Cal_0007 1/2	0,083 Cal_0007 2/2	0,543 196/16 Uri_00									
	0,068 Cal_0008 1/2	0,072 Cal_0008 2/2	0,392 220/16 Esc_0									

Fonte: A autora

Legenda: A concentração do DNA do *Mtb* variou de $1\text{ng}/\mu\text{L}$ a $1\text{fg}/\mu\text{L}$. Poços A (1 e 2): $1\text{ng}/\mu\text{L}$; Poços B (1 e 2): $100\text{pg}/\mu\text{L}$; Poços C (1 e 2): $10\text{pg}/\mu\text{L}$; Poços D (1 e 2): $1\text{pg}/\mu\text{L}$; Poços E (1 e 2): $100\text{fg}/\mu\text{L}$; Poços F (1 e 2): $10\text{fg}/\mu\text{L}$; Poços G (1 e 2): $1\text{fg}/\mu\text{L}$; Coluna 3 (A – H): Amostras clínicas de pacientes; Poços A (4 e 5): Controle negativo da PCR; Poços B (4 e 5): Controle positivo da PCR; Poços c (4 e 5): Controle negativo sem sonda; Poços D (4 e 5): Controle positivo sem sonda; Poços e (4 e 5): Branco.

Figura 9 - Gel de agarose a 1,5% corado com Blue Green Loading Dye.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19



Fonte: A autora

Legenda: Poços 1 – 4: amostras positivas $\rightarrow 1\text{ng}/\mu\text{L}$, $100\text{pg}/\mu\text{L}$, $10\text{pg}/\mu\text{L}$, $1\text{pg}/\mu\text{L}$. Poços 5-7: amostras negativas $\rightarrow 100\text{fg}/\mu\text{L}$, $10\text{fg}/\mu\text{L}$, $1\text{fg}/\mu\text{L}$. Poços 8-16: amostras de paciente (poços 8,9,10,11,14 \rightarrow amostras negativas; poços 12, 13, 15, 16 \rightarrow amostras positivas). Poço 17 \rightarrow controle negativo. Poço 18 \rightarrow Controle positivo. Poço 19 \rightarrow Marcador de pelo molecular.

7.3.2 Limite de detecção de DNA do *M. tuberculosis* diluído nas amostras biológicas

Para a curva de diluição do DNA da cepa de referência H37RV feita em urina, o limite de detecção da técnica foi de 1fg/μL da amostra. Já para a amostra de sangue, tanto plasma como PBMC apresentaram um limite de detecção de 10pg/μL da amostra. Para as amostras de líquido pleural e escarro, a menor concentração de DNA detectada também foi de 1fg/μL de amostra. Os resultados são mostrados na tabela 3.

Tabela 3 - Médias das leituras de absorbância (450nm e 620nm) do ensaio de detecção colorimétrica na avaliação do DNA extraído de cepa de referência H37Rv em diluições seriadas feitas nas amostras biológicas

DNA de cepa de referência H37Rv	STNPCR colorimétrica	
	Resultado	Média Absorbância
Urina		
1fg/μL	Positivo	0,280
Controle Negativo	Negativo	0,163
Controle Positivo	Positivo	0,365
Controle Placa*	Negativo	0,059
Branco**	Negativo	0,057
Plasma		
10pg/μL	Positivo	0,661
Controle Negativo	Negativo	0,163
Controle Positivo	Positivo	0,365
Controle Placa*	Negativo	0,059
Branco**	Negativo	0,057
PBMC		
10pg/μL	Positivo	0,538
Controle Negativo	Negativo	0,163
Controle Positivo	Positivo	0,365
Controle Placa*	Negativo	0,059
Branco**	Negativo	0,057
Líquido Pleural		
1fg/μL	Positivo	0,149
Controle Negativo	Negativo	0,118
Controle Positivo	Positivo	0,140
Controle Placa*	Negativo	0,054
Branco**	Negativo	0,053
Escarro		
1fg/μL	Positivo	0,221
Controle Negativo	Negativo	0,084
Controle Positivo	Positivo	0,179
Controle Placa*	Negativo	0,053
Branco**	Negativo	0,077

Fonte: A autora

Nota: * Poço sem sonda + Controle positivo da STNPCR;

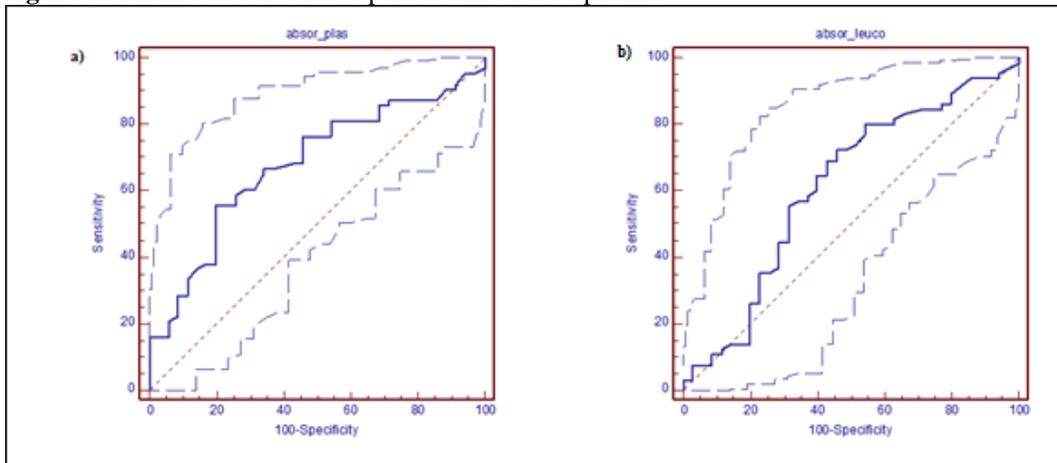
**Utilizou-se água no lugar da amostra de DNA. Sem sonda.

7.4 Análise da curva ROC nas diferentes amostras clínicas

7.4.1 Curva ROC das amostras de sangue (plasma e PBMC)

As leituras de absorvância da STNPCR colorimétrica automatizada nas amostras de sangue foram avaliadas pela análise da curva ROC. Nas amostras de plasma, o valor da área sob a curva foi de 0,679 (IC= 57,7% - 76,9%). Nos PBMC, a área sob a curva foi de 0,612 (IC= 51,0% - 70,8%) (Figura 10).

Figura 10 Análise da curva ROC para as amostras de plasma.

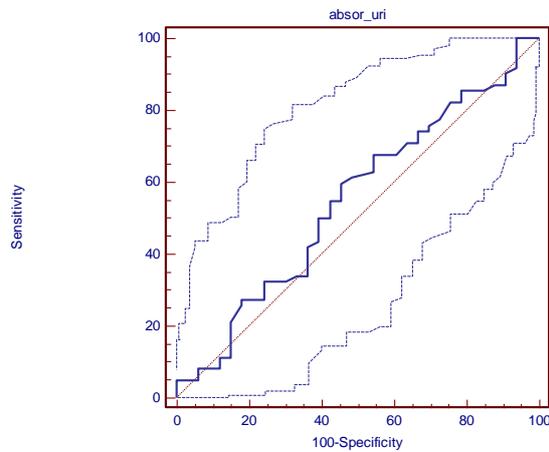


Nota: (a) plasma (n=98); (b) PBMC (n=100)

7.4.2 Curva ROC das amostras de urina

Nas amostras de urina, após análise da curva ROC, o valor da área sob a curva encontrado foi de 0,546 (IC= 44,1% - 64,9%) (Figura 11).

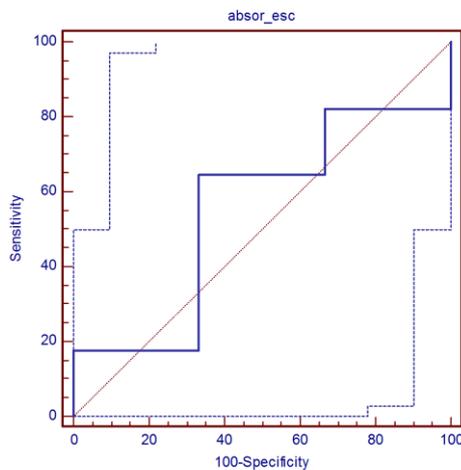
Figura 11 Análise da curva ROC para as amostras de urina (n=95)



7.4.3 Curva ROC das amostras de escarro

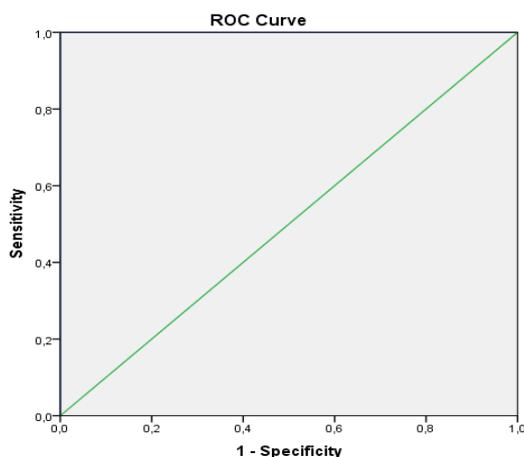
Nas amostras de escarro, o valor da área sobre a curva encontrado foi 0,549 (IC = 31,5% - 76,8%) (Figura 12).

Figura 12 Análise da curva ROC para as amostras de escarro (n=20)



7.4.4 Curva ROC das amostras de líquido pleural

Nas amostras de líquido pleural, o valor da área sobre a curva foi 1,0 (IC = 100% - 100%) (Figura 13).

Figura 13 Análise da curva ROC para as amostras de líquido pleural (n=5)

7.5 Definição do valor de corte (*cut off*) através da curva ROC

Após análise da curva ROC nos diferentes tipos de amostras biológicas, definimos um ponto de corte analisando os valores de sensibilidade e especificidade. Para as amostras de plasma, o valor do *cut off* foi definido em 0,110 (S=55,5%; E=80,0%). Já para os PBMC, o *cut off* foi igual a 0,090 (S=72,3%; E= 54,3%). O valor do *cut off* para as amostras de urina foi de 0,090 (S=61,3%; E=51,5%). No líquido pleural, o valor do *cut off* foi definido em 0,081 (S=75%; E=100%). Por fim, para as amostras de escarro, o *cut off* foi igual a 0,164 (S=64,7%; E=66,7%). Entretanto, apenas as amostras de plasma mostraram um resultado estatisticamente significativo, com $p=0,001$. Os resultados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Valor do *cut off* para as diferentes amostras biológicas através da análise da curva ROC

Amostra	<i>Cut off</i>	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	AUC*(IC=95%)	"p valor"	n
Plasma	0,110	55,5	80,0	0,679	0,001	98
PBMC	0,090	72,3	54,3	0,612	0,0512	100
Urina	0,092	61,3	51,5	0,545	0,451	95
Líquido pleural	0,081	75,0	100,0	1,000	0,157	5
Escarro	0,164	64,7	66,7	0,549	0,794	20

Fonte: A autora

Nota: *AUC = Área sob a curva

7.6 Índice kappa: gel de agarose x detecção colorimétrica

Calculamos o valor do índice Kappa a partir do *cut off* determinado pela curva ROC. A partir deste valor, definimos as amostras positivas e negativas e comparamos os resultados encontrados na detecção colorimétrica com os resultados encontrados no gel de agarose. Nem todos os valores encontrados foram concordantes entre si, assim como nem todos foram estatisticamente significantes. A amostra que teve maior grau de concordância foi o escarro, com valor de Kappa de 0,633 (concordância substancial).

Analizamos também a amostra de sangue como um todo, considerando o teste positivo quando pelo menos uma das duas amostras (plasma ou PBMC) foi positiva. Também avaliamos a amostra sangue + urina em conjunto. Da mesma forma, o teste foi considerado positivo quando pelo menos umas das três amostras (plasma, PBMC ou urina) foi positiva.

A análise do índice kappa também foi feita considerando o paciente, ou seja, se pelo menos uma amostra foi positiva (plasma, PBMC, urina, líquido pleural ou escarro), o paciente teve seu teste molecular considerado positivo, tanto na detecção em gel de agarose como na colorimétrica. O valor do kappa foi 0,184 ($p < 0,05$), logo, a concordância entre os testes foi considerada fraca. Os resultados são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Análise do índice kappa entre a detecção colorimétrica e o gel de agarose nas diferentes amostras biológicas.

Amostra	n	Valor de Kappa	Concordância	"p valor"
Plasma	98	0,026	Fraca	0,662
PBMC	100	0,132	Fraca	0,044
Urina	95	0,224	Razoável	0,030
Líquido Pleural	5	-0,176	Ausente	0,171
Escarro	20	0,633	Substancial	0,001
Sangue*	100	0,126	Fraca	0,072
Sangue e urina **	107	0,077	Fraca	0,273
Paciente***	115	0,184	Fraca	0,018

Fonte: A autora

Nota: *Análise feita em plasma + PBMC, em conjunto

**Análise feita em plasma + PBMC + urina, em conjunto

***Análise feita considerando paciente positivo quando qualquer amostra foi positiva

7.7 Índice kappa: detecção colorimétrica x cultura e baciloscopia

Analizamos o valor do Kappa através do *cut off* estabelecido pela curva ROC e comparamos o resultado da detecção colorimétrica com o resultado da cultura e baciloscopia nas amostras de escarro (Tabela 6).

Tabela 6 Análise do índice kappa: detecção colorimétrica X cultura e baciloscopia em amostras de escarro.

Técnica	n	Valor de Kappa	Concordância	"p valor"
Cultura	20	0,304	Fraca	0,127
Baciloscopia	20	0,144	Fraca	0,294

8 DISCUSSÃO

A TB causa adoecimento em milhões de pessoas todos os anos. É uma doença de alta prevalência e incidência, especialmente no continente africano e em regiões da Ásia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). O Brasil está no ranking dos países com maior carga de TB (BRASIL, 2016). Seu controle permanece como um desafio para a saúde pública. O diagnóstico da doença através das técnicas laboratoriais convencionais, que são a baciloscopia e a cultura, possuem limitações. Muitos casos deixam de ser detectados pela baciloscopia devido a sua baixa acurácia. Já a cultura, além de ser uma técnica bastante demorada, ainda requer laboratórios com instalações especializadas para seu manejo (SCHITO et al., 2016). No Brasil, o *gene Xpert® MTB/RIF*, é indicado para o diagnóstico de rotina da TBP em adultos e crianças. É um teste molecular rápido e automático, e tem uma sensibilidade de 88% em amostras de escarro. Em amostras extrapulmonares, um resultado negativo não exclui a possibilidade de TB (BRASIL, 2014; DUROVNI; SARACENI; HOF, VAN DEN; et al., 2014). Além disso, o *gene Xpert® MTB/RIF* pode não eliminar completamente a necessidade de se realizar a baciloscopia e a cultura, que são essenciais para a detecção de resistência a outras drogas (MAVENYENGWA et al., 2017)

O atraso no diagnóstico da TB devido à baixa sensibilidade da baciloscopia ou à demora no crescimento do bacilo em cultura, aumenta as taxas de morbidade, mortalidade e transmissão da doença (PINTO et al., 2016). O início do tratamento para TB é fundamental para o controle da doença e para a redução dos coeficientes de morbimortalidade. Assim, um diagnóstico preciso e correto é de suma importância para o início imediato do tratamento adequado (AGRAWAL et al., 2016).

O desenvolvimento de novas ferramentas moleculares tem grande importância no diagnóstico rápido da TB. As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, quando comparadas com a cultura, podem detectar, com semanas de antecedência, a presença do *M. tuberculosis* em uma amostra biológica em 80 a 90% dos casos de pacientes com suspeita de TB pulmonar (RYU, 2015).

O diagnóstico das formas extrapulmonares é mais difícil devido aos sintomas clínicos inespecíficos e à natureza das amostras, que têm uma concentração pequena de bacilos, além da dificuldade de obtenção de volume adequado para realização dos exames e por geralmente, serem amostras de difícil acesso para coleta. Comparadas ao diagnóstico convencional da TB, as técnicas de biologia molecular, especialmente a PCR, promovem um diagnóstico com melhor acurácia do que a baciloscopia e mais rápido do que a cultura (MEHTA et al., 2012).

Um dos pilares do *End TB Strategy*, programa lançado em 2014 pela OMS, é intensificar o desenvolvimento de pesquisas a fim de se encontrar novas ferramentas, intervenções e estratégias para o controle da doença (UPLEKAR et al., 2015; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). A proposta de um sistema molecular baseado na técnica de PCR, com detecção automatizada e objetiva, configura-se como uma ferramenta de diagnóstico rápida e precisa. A utilização da detecção colorimétrica automatizada baseia-se na facilidade de execução da técnica; na interpretação dos resultados, que é feita de maneira objetiva através do estabelecimento de um *cut off*; além da possibilidade de análise de uma grande quantidade de amostras ao mesmo tempo (SUE et al., 2014).

Alguns estudos demonstram o uso de métodos colorimétricos para a detecção dos produtos gerados pela PCR em inúmeros agentes infecciosos, com protocolos variados (MUSIANI et al., 2007; HAIRUL AINI et al., 2008; ADIKARAM et al., 2014). O sistema de detecção colorimétrica baseia-se na técnica de ELISA, por isso também é chamado PCR-ELISA, pois há junção das duas técnicas, com a diferença apenas no uso do DNA ao invés de proteínas (SUE et al., 2014). A especificidade do teste ocorre através do desenho de sondas específicas, que se ligam ao produto amplificado pela PCR (MUSIANI et al., 2007).

O sistema de detecção colorimétrica, ou PCR-ELISA, tem a vantagem de ser adaptável para diferentes sistemas de PCR e diferentes agentes infecciosos (DALY et al., 2002; PUPPE et al., 2004; SARAVANAN et al., 2004; MUSIANI et al., 2007; ABREU et al., 2012; ADIKARAM et al., 2014; COBAN, 2014). Para o diagnóstico da TB, é possível analisar não só a presença do *Mtb* em amostras clínicas, como também avaliar resistência a antimicrobianos. Para isso, é necessária a construção de sondas específicas para o gene de interesse. Adikaram et al (2014) desenvolveram um estudo para analisar a resistência à rifampicina através da detecção colorimétrica em microplacas. Para isso, desenharam seis diferentes sondas, correspondentes a diferentes pontos de mutação no genoma do *Mtb*, que amplificaram dois fragmentos de tamanhos diferentes. Verza et al (2009) avaliaram a resistência à isoniazida através de um ensaio colorimétrico (VERZA et al., 2009). O estudo foi feito em membranas de nylon, mas é possível adaptar ao sistema de microplacas de titulação.

Os sistemas de qPCR e *Xpert® MTB/RIF* são mais rápidos do que a PCR-ELISA devido ao fato de o processo de detecção do produto amplificado acontecer em tempo real, eliminando o tempo gasto numa etapa pós PCR para a visualização dos *amplicons* gerados. Entretanto, estes dois sistemas de PCR utilizam equipamentos de alto custo, o que dificulta a

sua implantação em laboratórios de rotina, especialmente em países com poucos recursos financeiros. Por outro lado, o sistema de detecção colorimétrica requer o uso de equipamentos já presentes em laboratórios de rotina diagnóstica (MUSIANI et al., 2007; SUE et al., 2014; PINTO et al., 2016). Adikaram et al (2014) fizeram uma análise comparativa para o estabelecimento de testes que avaliassem a resistência à drogas. O sistema colorimétrico utilizado em seu estudo teve custo mais baixo comparado ao *gene Xpert® MTB/RIF*. Enquanto que o custo para a instalação do *gene Xpert®* foi de US\$ 66.000, o custo do método colorimétrico foi de US\$ 5.000. O custo por teste foi de US\$ 55 no *gene Xpert®*. No ensaio colorimétrico foi de US\$ 35 (ADIKARAM et al., 2014).

Outra vantagem da STNPCR colorimétrica em relação ao *gene Xpert®* é a quantidade de amostra clínica necessária para o processamento. Para realização da STNPCR, 200µL de amostra é suficiente para a extração do DNA (LIRA, 2012; SALAZAR, 2012; SANTOS, 2012). Já para o *gene Xpert®*, é necessário pelo menos 1 ml de amostra (CAUSSE et al., 2011; PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA TUBERCULOSE, 2017). Para o diagnóstico da TB, o desenvolvimento de um método de fácil implantação e execução tem importância fundamental para a detecção rápida da doença. Assim, este trabalho objetivou desenvolver um protocolo de STNPCR colorimétrica automatizada aplicado diretamente em amostras biológicas de pacientes com suspeita de TB, bem como analisar seu desempenho em amostras pulmonares e extrapulmonares, visando oferecer um diagnóstico rápido e preciso da TB.

A STNPCR colorimétrica consiste de três etapas: a amplificação do DNA, a imobilização na placa de microtitulação do gene de interesse (sonda), e a etapa de detecção propriamente dita (SUE et al., 2014). A amplificação do DNA ocorre através da PCR e tem como diferença importante a adição de uma molécula de biotina na porção 5' de um dos oligonucleotídeos utilizados na reação, o OLI 5. Na etapa de imobilização, adiciona-se previamente na placa a sonda aminada, específica para se ligar a uma região interna ao DNA amplificado. Na fase de detecção, a adição de uma molécula de streptoavidina resulta na formação de um complexo streotpavidina-biotina de alta afinidade, que reage com um substrato e forma uma coloração (THERMO SCIENTIFIC, 2010; SUE et al., 2014). A vantagem deste sistema é que a leitura é feita em espectrofotômetro, e não depende da interpretação visual feita por uma pessoa, diminuindo o erro de leitura e interpretação dos resultados (MICHELON, 2008).

O protocolo de detecção colorimétrica desenvolvido neste trabalho resultou de adaptações previamente testadas por Lima (2014). Algumas adaptações foram realizadas para

obtenção de melhores resultados. A primeira mudança foi a escolha da placa utilizada, a Immunoplate Maxisorp™. Os resultados obtidos, comparados à placa utilizada por Lima (2014), mostraram melhor reprodutibilidade da técnica, apresentando semelhança entre si, quando os experimentos foram realizados em momentos diferentes.

Outra mudança importante foi a inclusão das etapas de lavagens feitas em lavadora automática. Lima (2014) frisou em seu trabalho que seus resultados sofreram influência do fato de suas lavagens terem sido feitas manualmente, o que interferiu na obtenção de resultados mais fidedignos. O tempo de cada lavagem ficou comprometido quando estas foram feitas à mão, resultando em mudanças, embora pequenas, nos resultados obtidos em seu estudo. Neste trabalho, todas as etapas de lavagem foram feitas em lavadora automática de placas, sem que houvesse diferenças no tempo e agitação de cada placa. Desta forma, como era previsto, os resultados obtidos mostraram-se reprodutíveis e mais sensíveis.

Ainda sobre a otimização da técnica, houve mais uma mudança em relação ao protocolo desenvolvido por Lima (2014). Na etapa de preparação da placa, em seu protocolo, após a sensibilização com a sonda aminada e depois de ser deixada *over night*, a placa passou por uma etapa de lavagem com a solução de lavagem 1 (SSC 2x + Tween® 20 a 0,1%). Na adaptação do protocolo feita neste estudo, esta etapa de lavagem foi eliminada. Entendemos que essa lavagem poderia remover parte da sonda ou toda a sonda fixada, ainda que a ligação desta com a placa seja específica, visto que a placa tem alta capacidade de ligação (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016).

Para avaliar a reprodutibilidade dos experimentos em placa, avaliamos o limite de detecção de DNA do *Mtb* inicialmente diluído em água Milli-Q®. Observamos que, a concentração mínima de DNA genômico do *Mtb* detectada foi de 1pg/μL. Assim como na detecção colorimétrica, o limite de detecção encontrado em gel de agarose também foi 1pg/μL, que equivale a cerca de 20 bactérias/ml de amostra (KOX et al., 1994; PORTILLO-GOMEZ et al., 2000; LIMA et al., 2009).

Após a diluição feita em água Milli-Q®, avaliamos o limite de detecção de DNA nas amostras clínicas. A concentração mínima de DNA detectada pela técnica variou de 10 pg/μL a 1fg/μL. A amostra que teve o resultado mais insatisfatório, com maior quantidade de DNA encontrada, foi o sangue, cujo limite de detecção foi 10pg/μL. Urina, líquido pleural e escarro apresentaram um limite de detecção de 1fg/μL, ou seja, quantidade de DNA menor que a presente em um único bacilo (PORTILLO-GOMEZ et al., 2000). Sobre o limite de detecção no sangue, este resultado pode ser explicado pela presença de inibidores neste tipo de amostra clínica. Como descrito na literatura, o sangue possui potentes inibidores da enzima Taq

polimerase, como o grupo heme, a hemoglobina, lactoferrina e imunoglobulina G (IgG) (MEHTA et al., 2012; SCHRADER et al., 2012; DUBEY et al., 2013), diferentemente das outras amostras clínicas estudadas. Para diminuir a presença destes inibidores, a separação dos elementos do sangue é realizada antes do processo de extração do DNA. As amostras são separadas em plasma e PBMC, sendo as células vermelhas descartadas a fim de reduzir a presença do grupo heme e da hemoglobina. O DNA no momento da extração, também passa por um processo de purificação. Ainda assim, depois deste processo de separação, moléculas inibidoras podem estar presentes, pois ainda não existe um procedimento ideal para a remoção desses inibidores (BÖDDINGHAUS et al., 2001; CRUZ et al., 2011).

O limite de detecção encontrado no sangue é equivalente a 20 bacilos/ml de amostra, dados que concordam com o trabalho realizado por Lima (2014). Mesmo com um limite de detecção maior do que o encontrado para as outras amostras, o sangue parece ser um espécime biológico útil na detecção do *Mtb*, especialmente em casos extrapulmonares, uma vez que os sítios de infecção para a coleta de amostras biológicas são de difícil acesso (MEHTA et al., 2012). Em contrapartida, o sangue é uma amostra clínica de coleta fácil, a nível ambulatorial e pouco invasiva (LIMA et al., 2015).

Nas amostras de urina, escarro e líquido pleural, o valor de limite de detecção encontrado foi inferior à quantidade de DNA presente em um bacilo, o que comprova que a STNPCR colorimétrica foi capaz de detectar quantidades mínimas de DNA, mesmo se o bacilo estiver fragmentado (PORTILLO-GOMEZ et al., 2000; LIMA, 2014). A hipótese para a detecção do bacilo em amostras de urina é que a bactéria pode ser filtrada pelos rins, o que torna possível a detecção do DNA neste tipo de amostra biológica. Assim como no sangue, a pesquisa de DNA do *Mtb* em urina é importante para auxiliar no diagnóstico da TB nos casos mais difíceis de serem elucidados, como nos casos de TBEP e/ou quando não é possível a obtenção de amostras de escarro nos casos de TBP (HEYDARI et al., 2014; MARANGU et al., 2015). O achado de DNA de *Mtb* em sangue e urina não significa que o paciente esteja com uremia nem septicemia causadas pelo *Mtb*. A inclusão destas amostras na pesquisa se referiu à utilização das mesmas para a pesquisa do DNA do bacilo no diagnóstico das formas pulmonares e extrapulmonares da TB (CRUZ et al., 2011; DUBEY et al., 2013; HEYDARI et al., 2014; LIMA, 2014; LIMA et al., 2015; MARANGU et al., 2015).

Os resultados encontrados para o limite de detecção da STNPCR colorimétrica evidenciam a importância do diagnóstico molecular como auxiliar na detecção da TB frente aos métodos laboratoriais convencionais. Para que a baciloscopia do escarro seja positiva,

são necessários de 5.000 a 10.000 bacilos/ml de amostra. Já para a cultura, a quantidade de bacilos necessária varia de 10 a 100/ml de escarro (BRASIL, 2008). O limite de detecção do *gene Xpert®* é de 131 unidades formadoras de colônias (UFC) por ml de escarro (BLAKEMORE et al., 2010; MARLOWE et al., 2011) Em contrapartida, como mencionado anteriormente, a STNPCR colorimétrica foi capaz de detectar quantidades mínimas de DNA do *Mtb*, variando de 10pg/ μ L, que equivale a quantidade de DNA presente em cerca de 20 bacilos, até 1fg/ μ L, que é menor do que a quantidade de DNA presente em um único bacilo, (KOX et al., 1994; PORTILLO-GOMEZ et al., 2000; LIMA, 2014) sendo, portanto mais sensível que a baciloscopia, cultura e *gene Xpert®*.

O presente estudo pode ser considerado pioneiro na análise da STNPCR colorimétrica em amostras extrapulmonares. A avaliação de amostras como sangue e urina, tem importância no diagnóstico nos casos onde amostras adequadas de escarro não são possíveis ou nos casos pulmonares com baciloscopia negativa, e nos casos de TBEP. Dados da literatura mostram a utilização de amostras oriundas do parênquima pulmonar na análise de sistemas de PCR colorimétrica (CHO et al., 1995; MICHELON, 2008; RIVERO, 2008; MICHELON et al., 2011). Mais recentemente, apenas o trabalho conduzido por Lima (2014), integrante da equipe do LIE, analisou o desempenho da técnica de STNPCR colorimétrica em amostras extrapulmonares (sangue e urina), assim como também avaliou amostras de escarro.

A curva ROC é uma ferramenta importante na avaliação de testes diagnósticos, uma vez que determina os valores de sensibilidade e especificidade comparando-os a um método de referência. Valores acima do ponto de corte são considerados positivos e, da mesma forma, valores abaixo do ponto de corte são considerados negativos. Assim, pode-se estimar os valores de sensibilidade e especificidade (MARTINEZ et al., 2003; ADIKARAM et al., 2014). Um teste ideal seria aquele que tem os valores de sensibilidade e especificidade de 100%. Entretanto, na prática, esses valores são obtidos em função do desempenho do outro, assim, quanto maior a sensibilidade menor a especificidade e vice-versa (MARGOTTO, 2010).

Após toda a etapa de otimização da STNPCR colorimétrica e definição do protocolo final, o *cut off* através da curva ROC foi definido para cada amostra clínica, baseado nos valores de sensibilidade e especificidade da técnica. Optamos por definir um ponto de corte onde houvesse um equilíbrio entre os possíveis valores de sensibilidade e especificidade, a fim de distinguir entre as amostras positivas e negativas (ADIKARAM et al., 2014). A amostra com melhor resultado encontrado foi o plasma, que teve seu *cut off* definido em 0,110 e mostrou um valor de AUC (*área under curve*, em português, área abaixo da curva) de 0,679,

com $p=0,001$. Um valor de kappa acima de 0,5 (valor no qual o teste não oferece capacidade discriminatória) é considerável, ainda que valores acima de 0,7 sejam ideais (LAGO, 2007). O valor da sensibilidade foi definido em 55,5% e especificidade foi de 80,0%. Embora o valor da área sob a curva não tenha sido considerado excelente, o teste foi capaz de distinguir entre amostras verdadeiramente positivas e as amostras falso positivas. Este resultado poderia ter sido melhor, caso o n amostral fosse maior, o que possibilitaria uma análise mais fidedigna dos valores de absorvância. Como já mencionado, não há dados na literatura que utilizem amostras de sangue em um sistema colorimétrico para a detecção do *Mtb*. Lima, em 2014, não obteve resultados de curva ROC em seu estudo, não havendo, portanto, valor de AUC para comparar com os valores obtidos no presente estudo.

Nas amostras de PBMC e urina, o valor do *cut off* foi definido em 0,090 e 0,092, respectivamente. O valor da área sob a curva para os leucócitos foi 0,612. Para a urina, 0,546. Nenhum dos dois foi estatisticamente significativo. Estes resultados indicam que o teste teve um poder discriminatório muito baixo, não diferenciando bem os resultados verdadeiro positivos e falso positivos (LAGO, 2007). Uma possível explicação está na natureza das amostras, que são paucibacilares, e na dificuldade de obtenção de um padrão ouro ideal, visto que a cultura apresenta baixa sensibilidade em amostras como a urina, com valores em torno de 25%, e o estabelecimento do diagnóstico final nos casos extrapulmonares é mais complicado (MEHTA et al., 2012; GANAVALLI et al., 2013; GHALEB et al., 2013).

No líquido pleural, o valor da área sob a curva atingiu o resultado ideal (1,0) no qual todas as amostras poderiam ser consideradas positivas, sem resultados falso-positivos. Entretanto, o resultado não foi estatisticamente significativo, porque a quantidade de amostras analisadas foi muito pequena. A escolha do líquido pleural para análise através da STNPCR colorimétrica foi devido à TB pleural ser a forma extrapulmonar mais frequente (MEHTA et al., 2012; TRAJMAN et al., 2014; RAMIREZ-LAPAUSA et al., 2015). Neste estudo, a forma pleural também foi a mais frequente entre as formas extrapulmonares, representando 20,5% dos casos.

A dificuldade na obtenção das amostras dos sítios específicos de infecção nos casos de TBEP (MEHTA et al., 2012) é evidenciada pelo baixo número de amostras de líquido pleural analisadas. Ainda assim, dos 8 casos de TB pleural diagnosticadas neste estudo, obtivemos 5 amostras do líquido pleural para serem analisadas. A sensibilidade da técnica, entretanto, mostrou valor considerável, 75%. A técnica é capaz de detectar o DNA do bacilo com uma sensibilidade muito maior do que a baciloscopia, por exemplo, que, para os casos de TB pleural tem uma sensibilidade menor que 5% (TRAJMAN et al., 2014).

Nas amostras de escarro, o valor da área sob a curva foi de 0,549, resultado que não teve valor estatisticamente significativo e mostrou capacidade discriminatória muito baixa entre amostras positivas e negativas. O ponto de corte foi de 0,164, com uma sensibilidade de 64,7% e especificidade de 66,7%. Michelin et al (2011), analisaram em seu estudo, 301 amostras de escarro induzido e 175 amostras de escarro espontâneo. As amostras foram analisadas através de detecção colorimétrica em placa de microtitulação, seguindo um protocolo parecido com o desenvolvido neste trabalho. O valor da absorbância foi medido no mesmo comprimento de onda (450nm, com re-filtro em 620nm). O *cut off* foi estabelecido pela média dos valores de 120 amostras de pacientes sem TB, de acordo com o padrão ouro. O valor encontrado foi de 0,250. A sensibilidade encontrada foi de 94% e a especificidade foi 100%. Os valores mais baixos encontrados no presente estudo devem-se à quantidade pequena de amostras analisadas. A análise de mais amostras possivelmente aumentará o valor da área sob a curva, bem como a obtenção de um ponto de corte com melhor resultado de sensibilidade e especificidade.

A comparação de resultados entre testes diagnósticos, ou a avaliação da reprodutibilidade entre as técnicas, pode ser medida através do índice kappa. Este índice informa a proporção de chance além daquela esperada pelo acaso (OLIVEIRA et al., 2010). Desta forma, analisamos através do índice kappa, a concordância entre a detecção colorimétrica e a detecção por eletroforese em gel de agarose, técnica já padronizada para a visualização dos produtos da STNPCR (LIMA et al., 2015).

O resultado da análise do índice kappa nas amostras de plasma e PBMC foi de 0,026 ($p=0,662$) e 0,132 ($p=0,044$) respectivamente. Estes valores mostram um nível de concordância fraco entre as duas técnicas. Lima (2014) encontrou resultados semelhantes, enfatizando que houve apenas uma ligeira concordância entre os dois métodos. A baixa concordância entre eles pode ser explicada pelo valor da sensibilidade da detecção colorimétrica nestas amostras. O valor da sensibilidade, especialmente no plasma (55,5%), pode refletir na análise do índice kappa, uma vez que a sensibilidade é a capacidade do teste de reconhecer casos verdadeiramente positivos (OLIVEIRA et al., 2010). Além disso, o limite de detecção para estas amostras foi um limite alto (10pg/ μ L) comparado aos valores encontrados para as outras amostras. Isto também reflete na análise da concordância entre os testes, uma vez que amostras de sangue são paucibacilares.

A comparação entre os dois métodos de detecção nas amostras de urina mostrou uma concordância razoável (0,224), embora seus resultados não tenham sido estatisticamente significantes. A sensibilidade da detecção colorimétrica em urina também teve um valor

considerado razoável (61,3%). Ainda que os dados não tenham sido significantes, a comparação do índice kappa com a sensibilidade da técnica mostrou-se coerente. Este resultado difere do encontrado por Lima (2014), que não encontrou concordância entre as duas técnicas quando avaliou a amostra de urina. Os valores de sensibilidade apresentados em seu trabalho foram também menores do que os encontrados no presente estudo, o que evidencia a hipótese de que a escolha do *cut off* e definição da sensibilidade da técnica podem influenciar na análise de concordância. Quando analisadas juntas, as amostras de sangue (plasma + PBMC) e “sangue e urina” (plasma + PBMC + urina), sendo estas consideradas positivas quando pelo menos uma das amostras foi positiva, o nível de concordância não divergiu quando comparadas isoladamente.

Nas amostras de líquido pleural, as duas técnicas se mostraram discordantes, uma vez que o valor encontrado foi menor que zero (valor de Kappa foi negativo). Isto se deve ao número de amostras analisadas, que foi muito pequeno, sendo insuficiente para realizar a comparação entre as duas técnicas e inferir resultados estatisticamente significantes.

A amostra de escarro foi a que apresentou melhor resultado, com um valor de kappa de 0,633 que mostra um grau de concordância substancial entre as duas técnicas. O resultado foi estatisticamente significativo. Lima (2014) também encontrou um grau de concordância considerável. A amostra de escarro é a amostra que tem maior concentração de bacilos, conseqüentemente maior concentração de DNA do *Mtb*. Por este motivo, é a amostra escolhida para a análise de sistemas de detecção colorimétrica em outros estudos (SCHERER et al., 2007, 2011; MICHELON et al., 2011). Embora a sensibilidade do escarro não tenha sido excelente (64,7%) e o número de amostras tenha sido pequeno, foi possível obter um nível de concordância considerável entre a detecção colorimétrica e o gel de agarose.

A análise do índice kappa também foi feita por paciente, ou seja, quando pelo menos uma de todas as amostras analisadas foi positiva, o paciente foi considerado positivo no teste molecular. O nível de concordância foi considerado fraco, contudo, estatisticamente significativo. Este resultado pode ser explicado também porque a sensibilidade da detecção colorimétrica, de uma forma geral, não apresentou valores muito altos, e porque é um sistema “novo” que está em fase de análise.

Quando comparamos a detecção colorimétrica com a baciloscopia e a cultura, em amostras de escarro, obtivemos um nível de concordância razoável (kappa = 0,304), entre a cultura e a STNPCR colorimétrica. Comparando a STNPCR colorimétrica com a baciloscopia, encontramos um nível de concordância fraco (kappa = 0,144). A cultura é o método padrão ouro para o diagnóstico da TB, por isso apresentou melhor resultado. É uma

técnica mais sensível que a baciloscopia e, através da cultura, podemos identificar a espécie microbiana. A baciloscopia é uma técnica com menor sensibilidade e não faz distinção entre as espécies (BRASIL, 2008).

É insuficiente concluir que STNPCR colorimétrica automatizada tenha baixo desempenho baseado na concordância com a eletroforese em gel de agarose. Embora a maioria das amostras tenham apresentado níveis de concordância considerados fracos, a amostra de escarro apresentou bom resultado, com nível de concordância substancial. Na amostra de urina, o valor do índice kappa foi melhor, quando comparado ao estudo de Lima (2014). O aumento no nível de concordância indica que a padronização do protocolo, com a inclusão de lavagens automatizadas, melhorou o desempenho da STNPCR colorimétrica. Outro fato importante que limitou as análises estatísticas foi o tamanho das amostras analisado. Os valores de sensibilidade e especificidade através da análise da curva ROC e os valores do índice kappa poderiam ser melhores caso o n amostral fosse maior.

Ainda assim, diante dos resultados obtidos, pode-se dizer que a STNPCR colorimétrica automatizada é um sistema molecular com boas chances de ser introduzido na rotina laboratorial para o diagnóstico auxiliar da TB. O teste mostrou ser rápido e de fácil execução, já que a experiência técnica requerida é usual para um laboratório de rotina, pois só utiliza um termociclador convencional, uma lavadora e um leitor de ELISA. Além disso, apresenta uma interpretação fácil e objetiva (CARDOSO, 2013; ADIKARAM et al., 2014), baseada em um ponto de corte.

Os resultados obtidos refletem a análise da junção de um sistema de PCR, a STNPCR, com um sistema colorimétrico de detecção de DNA, cujo protocolo é inédito, e foi desenvolvido através de adaptações iniciadas por Lima (2014). Neste estudo, o sistema foi padronizado e a análise de amostras biológicas começou a ser feita, sendo esses resultados preliminares. Portanto, a continuação desse estudo ainda se faz necessária para validar o sistema de detecção colorimétrica em cada amostra clínica.

9 CONCLUSÕES

a) O sistema de STNPCR colorimétrica com o uso de lavadora e incubadora de microplacas de titulação mostrou ser efetivo para o diagnóstico molecular da TB, de forma rápida e precisa.

b) A técnica foi otimizada e encontra-se padronizada para a avaliação de amostras clínicas de pacientes com TB, auxiliando o sistema SUS de saúde.

c) A STNPCR colorimétrica mostrou um ótimo limite de detecção, muito superior ao encontrado nos métodos convencionais de rotina, podendo ser utilizada para o diagnóstico auxiliar da TB, inclusive nos casos paucibacilares.

d) Os resultados obtidos neste estudo são preliminares. É necessário aumentar o número de amostras analisadas, principalmente amostras de escarro, que são amostras que contém maior concentração de bacilos, para avaliar melhor os valores de sensibilidade, de especificidade e do índice kappa.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. **BioTechniques**, Natick, v. 33, n. 6, p. 1210–2, 1214, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12503300>>. Acesso em: 1 out. 2015.
- ABREU, A. L. et al. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. **Virology Journal**, London, v. 9, p. 262, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23131123>>. Acesso em: 5 jan. 2017.
- ADIKARAM, C. P.; PERERA, J.; WIJESUNDERA, S. S. DNA probe based colorimetric method for detection of rifampicin resistance of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 92–98, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.11.006>>. Acesso em: 14 dez. 2016.
- AGRAWAL, M. et al. Comparative study of GeneXpert with ZN stain and culture in samples of suspected pulmonary tuberculosis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, Dheli, v. 10, n. 5. Disponível em: <http://jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2016&volume=10&issue=5&page=DC09&issn=0973-709x&id=7755>. Acesso em: 14 dez. 2016.
- 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, 1999.
- ANOCHIE, P. I. et al. Recent advances in the diagnosis of mycobacterium tuberculosis. **Germs**, Bucharest, v. 2, n. 3, p. 110–120, 2012. Disponível em: <<http://www.germs.ro/en/Articles/Recent-advances-in-the-diagnosis-of-Mycobacterium-tuberculosis-123>>. Acesso em: 20 nov. 2016.
- ASSIS, N. C. S. E. AL. Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 1–7, 2007.
- BARRY, P. M. et al. Getting to Zero: Tuberculosis Elimination in California. **Current epidemiology reports**, v. 3, p. 136–144, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27218013>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4846683>>. Acesso em: 15 out. 2016.
- BELO, M. T. C. T.; LUIZ, R. R.; HANSON, C.; et al. Comunicação Breve. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 33, n. 5, p. 579–582, 2002.
- BENTO, J. et al. Métodos de diagnóstico em Tuberculose. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 24, n. 1, p. 145–154, 2011. Disponível em: <<http://www.actamedicaportuguesa.com/pdf/2011-24/1/145-154.pdf>>. Acesso em: 01 out. 2016.
- BERTOLOZZI, M. R. et al. O controle da tuberculose um desafio para a saúde pública. **Revista de Medicina (São Paulo)**, São Paulo, v. 93, n. 2, p. 83–89, 2014. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/97330>>. Acesso em: 20 set. 2016.

BLAKEMORE, R. et al. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 7, p. 2495–2501, 2010.

BÖDDINGHAUS, B. et al. Removal of PCR Inhibitors by Silica Membranes : Evaluating the Amplicor Mycobacterium tuberculosis Kit. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 10, p. 3750–3752, 2001.

BOMBARDA, S.; FIGUEIREDO, C. M.; FUNARI, M. B. D. G.; et al. Imagem em tuberculose pulmonar. **Jornal de Pneumologia**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 329–340, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-35862001000600007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 25 nov. 2016.

BRANCO, B. C.; ROCHA, R. M. Interpretação Clínica Atual do Teste do PPD: Uma Abordagem Elucidativa. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 16, n. 2, p. 249–252, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**, Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, Brasília, 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes**, Brasília, 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância em saúde**, Brasília, 2014.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, v.47, n. 13, 2016.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, v. 48, n. 8, 2017.

CAMARGO, K. R. et al. The adoption of a new diagnostic technology for tuberculosis in two Brazilian cities from the perspective of patients and healthcare workers: a qualitative study. **BMC health services research**, London, v. 15, p. 275, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4507311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

CAMPOS, H. Manejo da doença micobacteriana não-tuberculosa. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 2, p. 39-50, 2000.

CAMPOS, H. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 29–35, 2006a. Disponível em: <<http://www.saudedireta.com.br/docsupload/13404591932.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2016.

CAMPOS, H. Diagnóstico da tuberculose. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 92–99,

2006b. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=612388&indexSearch=ID>>. Acesso em: 15 out. 2016.

CAPONE, D. et al. Tuberculose Extrapulmonar. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 54–67, 2006.

CARDOSO, Fernanda Alvarenga. **Desenvolvimento e validação de um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana em amostras de sangue periférico. 2013.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2013.

CAUSSE, M. et al. Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 8, p. 3065–3067, 2011.

CHO, S. et al. Colorimetric Microwell Plate Hybridization Assay for Detection of Amplified Mycobacterium tuberculosis DNA from Sputum Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 3, p. 752–754, 1995.

COBAN, A. Y. A new rapid colourimetric method for testing Mycobacterium tuberculosis susceptibility to isoniazid and rifampicin: A crystal violet decolourisation assay. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 2, p. 246–249, 2014.

COMAS, I. et al. Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. **Nature Genetics**, New York, v. 45, n. 10, p. 1176–1182, 2013.

CORRÊA, E. M.; POSSIK, P. A. A análise de DNA por eletroforese. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). PADILHA, A. R. S. **Resolução nº 441 de 12 de maio de 2011**, Brasília, 2011. Disponível em: <<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2011/Reso441.pdf>>. Acesso em: 15 de out. 2016.

CRUZ, H. L. A. et al. Evaluation of a nested-pcr for Mycobacterium tuberculosis detection in blood and urine samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, p. 321–329, 2011.

DALY, P.; COLLIER, T.; DOYLE, S. PCR-ELISA Detection of Escherichia coli in Milk. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, n. p. 222–226, 2002.

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. The biology of mycobacterium tuberculosis infection. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, Pavia, v. 5, n. 1, 2013.

DHEDA, K.; BARRY, C. E.; MAARTENS, G. Tuberculosis. **The Lancet**, London, v. 387, n. 10024, p. 1211–1226, 2016.

DUBEY, A.; GWAL, R.; AGRAWAL, S. Mycobacterium tuberculosis detection in blood

using multiplex nested polymerase chain reaction. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 17, n. 10, p. 1341–1345, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24025388>>. Acesso em: 03 out. 2016.

DUROVNI, B. et al. Operational lessons drawn from pilot implementation of Xpert MTB/Rif in Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 92, n. 8, p. 613–7, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4147406&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

DUROVNI, B.; SARACENI, V.; HOF, S. VAN DEN; et al. Impact of Replacing Smear Microscopy with Xpert MTB/RIF for Diagnosing Tuberculosis in Brazil: A Stepped-Wedge Cluster-Randomized Trial. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 11, n. 12, 2014.

FERRI, A. O. et al. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 15, n. 24, p. 105–212, 2014.

FURINI, A. A. C. et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex by nested polymerase chain reaction in pulmonary and extrapulmonary specimens. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 39, n. 6, p. 711–718, 2013.

GALAGAN, J. E. Genomic insights into tuberculosis. **Nature Reviews - Genetics**, London, v. 15, p. 307–320, 2014.

GAMBHIR, S. et al. Imaging in Extrapulmonary Tuberculosis. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 56, p. 237–247, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971216312206>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

GANAVALLI, S. A. et al. Pcr as a diagnostic tool for extra-pulmonary tuberculosis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, Nagar, v. 7, n. 6, p. 1012–1015, 2013.

GHALEB, K.; AFIFI, M.; EL-GOHARY, M. Assessment of diagnostic techniques of urinary tuberculosis. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, Pavia, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2013.

GHOLLOBI, A. et al. Comparison of Culture and PCR Methods for Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in Different Clinical Specimens. **Jundishapur Journal of Microbiology**, Ahvaz, v. 7, n. 2, 2014.

GUARINES, Klarissa Miranda. **Avaliação de duas técnicas de reação em cadeia da polimerase na detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em diferentes amostras biológicas**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

GUEDES, Gabriela de Moraes Rêgo. **Avaliação dos testes QuantiFERON-TB GOLD e Nested PCR em único tubo no diagnóstico de tuberculose em pacientes imunodeprimidos**. 2013. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

HAIRUL AINI, H. et al. Comparison of Sybr Green I, ELISA and conventional agarose gel-based PCR in the detection of infectious bursal disease virus. **Microbiological Research**,

Jena, v. 163, n. 5, p. 556–563, 2008.

HAJIABDOLBAGHI, M. et al. Application of peripheral blood Mycobacterium tuberculosis PCR for diagnosis of tuberculosis patients. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Roma, v. 18, n. 2, p. 185–189, 2014.

HYPLEX Multiplex-Plattformtechnologie: Teil 1. [S.l.]: **Management & Krankenhaus**, 2006. Disponível em: <http://www.management-krankenhaus.de/sites/management-krankenhaus.de/files/images/special/23547281__original.jpg>. Acesso em: <30 abr. 2017>.

HEYDARI, A. A.; DANESH, M. R. M.; GHAZVINI, K. Urine PCR evaluation to diagnose pulmonary tuberculosis. **Jundishapur Journal of Microbiology**, Ahvaz, v. 7, n. 3, p. 7–10, 2014.

HORTON, K. C. et al. Sex Differences in Tuberculosis Burden and Notifications in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 13, n. 9, 2016.

IBANÊS, A. S.; CARNEIRO JUNIOR, N. Panorama internacional e nacional da estratégia do tratamento diretamente supervisionado (DOTS) nas políticas de controle da tuberculose. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, Santo André, v. 38, n. 1, p. 133–141, 2013.

KOX, L. F. et al. A more reliable PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 3, p. 672–678, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8195377>>. Acesso em: 25 out. 2016.
LAGO, Eloi Marcos de Oliveira. **Avaliação do desempenho diagnóstico do teste ELISA para a cisticercose em inquéritos sorológicos**, 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1977.

LAPA E SILVA, J. R.; BOÉCHAT, N. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 388–394, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132004000400014&lng=pt&nrm=iso&tIng=pt>. Acesso em: 03 nov. 2016.

LAWN, S. D.; NICOL, M. P. Xpert® MTB / RIF assay : development , evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. **Future Microbiology**, London, v. 6, n. 9, p. 1067–1082, 2011.

LAWN, S. D.; ZUMLA, A. I. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis using the Xpert® MTB / RIF assay. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 10, n. 6, p. 631–635, 2012.

LCP RESEARCH GROUP. **Streptavidin Coated Microtiter microplates for PCR-ELISA**. [s.l.], 2014.

LEE, P. Y. et al. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. **Journal**

of **Visualized Experiments**, Los Angeles, n. 62, p. 3791–3923, 2012. Disponível em: <<http://www.jove.com/video/3923>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

LEE, S. H. Tuberculosis infection and latent tuberculosis. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, Beijing, v. 79, n. 4, p. 201–206, 2016.

LIMA, J. F. C. et al. Performance of nested PCR in the specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex in blood samples of pediatric patients. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 35, n. 7, p. 690–697, 2009.

LIMA, Juliana Figueirêdo da Costa. **Desenvolvimento da Nested PCR em único tubo (STNPCR) com detecção colorimétrica para o diagnóstico de tuberculose**, 2014. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

LIMA, J. F. C. et al. Single-tube nested PCR assay with in-house DNA extraction for Mycobacterium tuberculosis detection in blood and urine. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 48, n. 6, p. 731–738, 2015.

LIRA, Laís Ariane de Siqueira. **Análise do desempenho da técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico da tuberculose pulmonar**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, 2012. Disponível em: <<http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2012lira-las.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

LOPES, A. J. et al. Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 4, p. 253–261, 2006.

LUO, R. F.; BANAEI, N. Molecular approaches and biomarkers for detection of mycobacterium tuberculosis. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 33, n. 3, p. 553–566, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.012>>. Acesso em: 23 nov. 2016.

MACHADO, P. C. et al. Comparação do teste tuberculínico e do ensaio de liberação de interferon-gama para diagnóstico de tuberculose latente em agentes comunitários de saúde do Sul do Brasil, Rio Grande do Sul, 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 675–681, 2014. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742014000400009&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 25 nov. 2016.

MACIEL, M. D. S. et al. A história da tuberculose no Brasil : os muitos tons (de cinza) da miséria. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 226–230, 2012.

MARANGU, D.; DEVINE, B.; JOHN-STEWART, G. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests in urine for pulmonary tuberculosis: A meta-analysis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 19, n. 11, p. 1339–1347, 2015.

MARGOTTO, P. R. **Curva ROC: Como fazer e interpretar no SPSS**. Escola Superior de Ciências da Saúde, Brasília, 2010.

MARLOWE, E. M. et al. Evaluation of the cepheid xpert MTB/RIF assay for direct detection of mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens. **Journal of Clinical**

Microbiology, Washington, v. 49, n. 4, p. 1621–1623, 2011.

MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 7–31, 2003.

MAVENYENGWA, R. T.; SHADUKA, E.; MAPOSA, I. Evaluation of the Xpert® MTB / RIF assay and microscopy for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in Namibia. **Infectious Diseases of Poverty**, Windhoek, v. 6, n. 13, p. 1–5, 2017. **Infectious Diseases of Poverty**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40249-016-0213-y>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

MAYNARD-SMITH, L. et al. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary and pulmonary tuberculosis when testing non-respiratory samples: a systematic review. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 14, n. 1, p. 709, 2014. Disponível em: <<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-014-0709-7>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

MEDRONHO, R. A. et al. **Epidemiologia**. 2 ed., Rio de Janeiro, Editora Atheneu, 2008.

MEHTA, P. K. et al. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 20–36, 2012. Disponível em: <<http://femsim.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-695X.2012.00987.x>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

MELO, Fábio Lopes. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em PCR para a detecção de Schistosoma mansoni**, 2006. Tese (Doutorado) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

MICHELON, Candice Tosi. **Detecção de DNA de Mycobacterium tuberculosis através de hibridização em microplacas**, 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MICHELON, C. T. et al. Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for Mycobacterium tuberculosis detection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 2, p. 194–199, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537680>>. Acesso em: 14 out. 2016.

MITANO, F. et al. Discursos sobre a terapia de curta duração para o controle da tuberculose. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 70, n. 1, p. 126–132, 2017.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Série - Biologia molecular Atualização Parte 2 - Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 140, 2004. Disponível em: <<http://livrozilla.com/doc/428925/série---biologia-molecular-atualização-parte-2>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

MOUTINHO, I. L. D. Tuberculose : aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 21, n. 1, p. 42–48, 2011.

MUSIANI, M. et al. Qualitative PCR-ELISA protocol for the detection and typing of viral genomes. **Nature protocols**, London, v. 2, n. 10, p. 2502–10, 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17947992>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

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 Medicina**, São Paulo, v. 67, 2010. Disponível em:

<http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=4499>. Acesso em: 26 jan. 2017.

OLIVEIRA, E. et al. Eletroforese: conceitos e aplicações. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 11, n. 22, p. 1129–1149, 2015.

OLIVEIRA, G. M. et al. Systematic review of diagnostic tests accuracy: a narrative review. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 2, p. 153–156, 2010.

OLIVEIRA, Tânia Maria dos Santos. **PCR em tempo real: métodos e aplicações. 2010.**

Dissertação (Mestrado) - **Universidade de Aveiro**, Aveiro, 2010. Disponível em:

<<http://hdl.handle.net/10773/7230>>. Acesso em: 16 fev. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Use of tuberculosis release assays (IGRAs) in low- and middle- income countries**, Geneve, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global tuberculosis report 2015**, Geneve, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global tuberculosis report 2016**, Geneve, 2016.

PAZ, F. A. Z.; BERCINI, M. A. Doenças Emergentes e Reemergentes no Contexto da Saúde Pública. **Boletim da saúde. Escola de Saúde Pública**, Porto Alegre, v. 23, n.1, 2009.

Disponível em: <<http://www.boletimdasaude.rs.gov.br/conteudo/1441/doencas-emergentes-e-reemergentes-no-contexto-da-saude-publica>>. Acesso em: 13 maio 2017.

PCR - Variations to the System | **ABM Inc.** [S.l.], [201?]. Disponível em:

<https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_variation_system.php>. Acesso em: 25 abr. 2017.

PEDRO, H. P. et al. Cenário atual da tuberculose. **Hanseologia**, Bauru, v. 39, n. 1, p. 40–55, 2015.

PIATEK, A. S. et al. GeneXpert for TB diagnosis: planned and purposeful implementation.

Global Health: Science and Practice, Baltimore, v. 1, n. 1, p. 18–23, 2013. Disponível em:

<<http://www.ghspjournal.org/cgi/doi/10.9745/GHSP-D-12-00004>>. Acesso em: 22 jan. 2017.

PINHATA, Juliana Maria Watanabe. **Deteção do Complexo Mycobacterium tuberculosis em escarro por PCR em tempo real**, 2014. Dissertação (Mestrado). Secretaria de Saúde de São Paulo, São Paulo, 2014.

PINHATI, F. R. Eletroforese de DNA: Dos Laboratórios de Biologia Molecular para as Salas de Aula. **Experimentação no ensino de química**, São Paulo, v. 37, n. 14, p. 316–319, 2015.

PINTO, M. et al. Cost-effectiveness of the Xpert MTB/RIF assay for tuberculosis diagnosis in Brazil. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 20, n. 5, p. 611–618, 2016.

PORTILLO-GOMEZ, L.; MORRIS, S. L.; PANDURO, A. Rapid and efficient detection of extra-pulmonary Mycobacterium tuberculosis by PCR analysis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 4, n. 4, p. 361–370, 2000. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/iatld/ijtd/2000/00000004/00000004/art00014>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA TUBERCULOSE. **Teste Rápido Molecular para Tuberculose (TRM-TB)**. Disponível em: <<http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=LQ7fVwnHqpo%3D>>. Acesso em: 4 maio 2017.

PUPPE, W. et al. Evaluation of a multiplex reverse transcriptase PCR ELISA for the detection of nine respiratory tract pathogens. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 165–174, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138665320300283X>>. Acesso em: 4 maio 2017.

QUEIROZ, Edna Maria. **Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e terapêuticos em indivíduos com e sem infecção pelo hiv**, 2008. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2008.

RAMIREZ-LAPAUSA, M.; MENENDEZ-SALDANHA, A.; NOGUERADO-ASENSIO, A. Extrapulmonary tuberculosis : an overview. **Revista española de sanidad penitenciaria**, Alicante, v. 15, p. 3–11, 2015.

RAMOS, Elisabete Manuela de Sousa. **Sistemas Multiplex para a detecção e caracterização Molecular de Infecções**, 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012. Disponível em: <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3575/3/T_13067.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2017.

RIVERO, Martha Gabriela Celle. **Avaliação de um teste in house de PCR-colorimétrico em placa para o diagnóstico de Tuberculose Pulmonar**, 2008. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2008.

ROCHA, A. L. D. C. et al. Ministério da Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Controle da Tuberculose Uma Proposta de Integração Ensino-Serviço**. Rio de Janeiro, 2008.

ROSEMBERG, J. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 35–59, 2001. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-460X2001000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 03 out. 2016.

ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. **Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular**. 1 ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara, 2006.

- ROYCHOWDHURY, T.; MANDAL, S.; BHATTACHARYA, A. Analysis of IS6110 insertion sites provide a glimpse into genome evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Scientific reports**, London, v. 5, n. July, p. 12567, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4517164&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14 jan. 2017.
- ROZALES, Franciéli Pedrotti. **Real Time-PCR e NESTED-PCR no diagnóstico da tuberculose pulmonar**, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- ROZALES, F. P. et al. PCR to detect *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory tract samples: evaluation of clinical data. **Epidemiology and infection**, Cambridge, v. 142, n. 7, p. 1517–1523, 2014.
- RYU, Y. J. Diagnosis of pulmonary tuberculosis: Recent advances. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, Beijing, v. 78, p. 64–71, 2015.
- SÁ, L. D. et al. Providing health care to women with tuberculosis: The family focus perspective. **Texto e Contexto Enfermagem**, Santa Catarina, v. 21, n. 2, p. 409–417, 2012. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84865645618&partnerID=40&md5=f03e2803f8ff018417e2fd15a1039684>>. Acesso em: 12 dez. 2016.
- SALAZAR, Marcela Pereira. **Avaliação da Nested PCR em único tubo como ferramenta diagnóstica da tuberculose**, 2012. Monografia (Bacharelado em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.
- SAN PEDRO, A.; OLIVEIRA, R. M. Tuberculose e indicadores socioeconômicos : revisão sistemática da literatura. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 33, n. 4, p. 294–301, 2013.
- SANTOS, Fabiana Cristina Fulco. **Avaliação do desempenho da técnica de PCR em tempo real em diferentes amostras biológicas utilizadas para o diagnóstico da tuberculose extrapulmonar**, 2012. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.
- SARAVANAN, P. et al. Development of a N gene-based PCR-ELISA for detection of Pestes-des-petits-ruminants virus in clinical samples. **Acta Virologica**, Praha, v. 48, n. 4, p. 249–255, 2004.
- SCHERER, L. C. et al. PCR colorimetric dot-blot assay and clinical pretest probability for diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in smear-negative patients. **BMC public health**, London, v. 7, p. 356, 2007.
- SCHERER, L. C. et al. Comparison of two laboratory-developed PCR methods for the diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Brazilian patients with and without HIV infection. **BMC Pulmonary Medicine**, London, v. 11, n. 1, p. 15, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2466/11/15>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

- SCHITO, M.; HANNA, D.; ZUMLA, A. Tuberculosis Eradication versus Control. **International journal of infectious diseases**, Hamilton, v. 56, p. 10–13, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971216312243%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27872016>>. Acesso em: 17 jan. 2017.
- SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 113, p. 1014–1026, 2012.
- SILVA, Maria Almerice Lopes. **Desenvolvimento de sistemas baseados em Nested-PCR convencional e em único tubo para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral**, 2012. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.
- SINGH, U. B. et al. Genotypic, phenotypic and clinical validation of genexpert in extra-pulmonary and pulmonary tuberculosis in India. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 2, 2016.
- SMITH, A. et al. Health care workers' gender bias in testing could contribute to missed tuberculosis among women in South Africa. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 20, n. 3, p. 350–356, 2016.
- SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 463–496, 2003. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/16/3/463.short>>. Acesso em: 15 dez. 2016.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 35, n. 10, p. 1018–1048, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v35n10/v35n10a11.pdf>>. Acesso em: 02 out. 2016.
- SOUZA, L. O. et al. Terapia de curta duração da tuberculose : uma análise discursiva. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 69, n. 6, p. 1154–1163, 2016.
- STEINGART, K. R. et al. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. **Cochrane database of systematic reviews**, Oxford, v. 1, n. 1, 2014.
- STUART, M. et al. Progress toward a Simplified Polymerase Chain Reaction and Its Application to Diagnosis of Tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 4, p. 776–782, 1993.
- SUCCI, R. C. M. O desafio de diagnosticar a infecção tuberculosa na criança. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 2–3, 2014.
- SUE, M. J. et al. Application of PCR-ELISA in Molecular Diagnosis. **BioMed Research International**, London, 2014.
- TANG, J.; YAM, W.-C.; CHEN, Z. *Mycobacterium tuberculosis* infection and vaccine development. **Tuberculosis**, Edinburgh, v. 98, p. 30–41, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472979215302973>>. Acesso em: 23 abr. 2017.

TAYLOR, N. et al. Can a simple flotation method lower the limit of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in extrapulmonary samples analyzed by the GeneXpert MTB/RIF Assay? **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 7, p. 2272–2276, 2012.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/456537>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

THERMO SCIENTIFIC. **ELISA technical guide and protocols**, Rockford, v. 65, n. 815, p. 1–14, 2010. Disponível em: <<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

THERON, G. et al. Determinants of PCR performance (Xpert MTB/RIF), including bacterial load and inhibition, for TB diagnosis using specimens from different body compartments. **Scientific Reports**, London, v. 4, p. 5658, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25014250>>. Acesso em: 25 mar. 2017.

TRAJMAN, A. et al. Accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of pleural tuberculosis. **Respiratory Medicine**, London, v. 108, n. 6, p. 918–923, 2014.

UPLEKAR, M. et al. WHO 's new End TB Strategy. **The lancet**, London, v. 385, p. 1799–1801, 2015.

VERZA, M. et al. In house colorimetric reverse hybridisation assay for detection of the mutation most frequently associated with resistance to isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 5, p. 710–714, 2009.

VITTOR, A. Y.; GARLAND, J. M.; GILMAN, R. H. Molecular Diagnosis of TB in the HIV Positive Population. **Annals of Global Health**, Philadelphia, v. 80, n. 6, p. 476–485, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214999615000028>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

WILSON, M. L. Recent advances in the laboratory detection of mycobacterium tuberculosis complex and drug resistance. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 52, n. 11, p. 1350–1355, 2011.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: "Avaliação da acurácia de método molecular automatizado na detecção rápida do Mycobacterium tuberculosis para o diagnóstico das formas paucibacilares da tuberculose em populações vulneráveis".

Pesquisador responsável: Marcela Pereira Salazar

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 01/06/2015

Registro no CAAE: 45687215.2.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 1.322.304

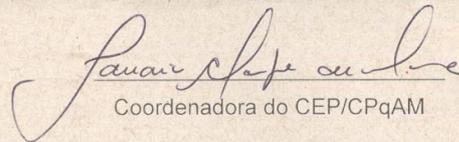
PARECER

O Comitê avaliou 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 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 25 de novembro de 2015.


Coordenadora do CEP/CPqAM

Janaina Campos de Miranda
Pesquisadora em Saúde Pública
Coordenadora
Mat. SIAPE 464777
CEP / CPqAM / FIOCRUZ

Câmpus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

