

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

RAYSSA MARIA PASTICK JARES DA COSTA

**Avaliação do desempenho da PCR em tempo real
utilizando insumos nacionais em amostras
biológicas de pacientes com tuberculose
extrapulmonar**

Recife
2021

RAYSSA MARIA PASTICK JARES DA COSTA

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA PCR EM TEMPO REAL UTILIZANDO
INSUMOS NACIONAIS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM
TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR

Trabalho de Dissertação apresentado ao
Curso de Mestrado em Biociências e
Biotecnologia do Instituto Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz,
como requisito à obtenção do grau de
mestre em Ciências.

Orientador: Dra. Haiana Charifker Schindler

Coorientador: Dra. Rosana de Albuquerque Montenegro

Recife

2021

Catálogo na fonte:
Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- C837a** Costa, Rayssa Maria Pastick Jares da.
Avaliação do desempenho da PCR em tempo real utilizando insumos nacionais em amostras biológicas de pacientes com tuberculose extrapulmonar / Rayssa Maria Pastick Jares da Costa. - Recife: [s.n.], 2019.
112 p. : ilus., graf., tab., mapas ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado em Biocências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.
Orientadora: Haiana Charifker Schindler; coorientadora: Rosana de Albuquerque Montenegro.
1. Mycobacterium tuberculosis - isolamento & purificação. 2. Tuberculose - diagnóstico. 3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real - métodos. 4. Tuberculose - microbiologia. 5. Sensibilidade e especificidade. 6. Estudos Prospectivos. I. Schindler, Haiana Charifker. II. Montenegro, Rosana de Albuquerque. III. Título.

CDU 616-002.5

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA PCR EM TEMPO REAL
UTILIZANDO INSUMOS NACIONAIS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS
DE PACIENTES COM TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR

Trabalho de Dissertação
apresentado ao Curso de
Mestrado em Biociências e
Biotecnologia do Instituto Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz, como requisito à obtenção
do grau de mestre em Ciências.

Aprovada em: 30 de março de 2021

BANCA EXAMINADORA

Dra. Haiana Charifker Schindler (Orientadora)
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Fábio Lopes de Melo
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Heidi Lacerda Alves da Cruz
Universidade Federal de Pernambuco (Departamento de
genética)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar sou grata a Deus por me permitir alcançar mais um sonho, por me ensinar o valor do saber, me guiar em minhas decisões e por ter colocado em minha vida as pessoas que tanto amo e que me apoiaram durante toda minha caminhada.

Obrigada a todos os meus familiares por sempre me darem os melhores conselhos e me ajudar a formar quem sou hoje. Em especial obrigada a minha Mãe (Maura) e minha que Tia (Mônica), que é uma segunda mãe para mim, e que nunca mediram esforços para dar o melhor a mim e aos meus irmãos (Henrique e Vinícius) e nos transmitiram os melhores valores. Obrigada por todo amor dado a mim pelo meu Tio (Marcilo), meus Irmãos e todos os meus familiares, pois isso me manteve mais forte para ultrapassar qualquer obstáculo.

Não menos importante, sou muito grata a todos os meus amigos de colégio (Janaína Melo e Tatyane Sampaio), da faculdade (Érica Oliveira, Isabella Ralph, Rafael Vinícius e Weverton Alves) e do mestrado (Ana Emilia) que me ajudaram até nos meus momentos mais difíceis. Que Deus sempre regue nossas amizades, pois para quem ama não há barreiras que impeçam um reencontro. E eu amo vocês todos aqui já citados.

Obrigada à todos do Laboratório de Imunoepidemiologia (LIE), pois foram os primeiros à abrir as portas da oportunidade para mim e transmitiram todo o conhecimentos possível para mim, não se detendo apenas as áreas de pesquisa deste trabalho, mas também experiências que recordarei para o resto da vida. Gostaria de agradecer especialmente à Rosana Montenegro, minha coorientadora que vem trilhando comigo desde a minha iniciação científica, graduação e agora no meu mestrado. Obrigada pela sua paciência, boa vontade, e dedicação. E também a Haiana Schindler, minha orientadora nesse trabalho como também durante a minha iniciação científica que sempre foi receptiva comigo e se dispôs à me ajudar a qualquer momento. Sou muito grata por ter sido tão bem acolhida pela família do LIE.

Definitivamente, todos que cruzaram meu caminho durante esta caminhada me ajudaram a crescer, transmitiram muitos ensinamentos e colaboraram com o profissional e pessoa que me tornei, obrigada.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin, 1961.

COSTA, Rayssa Maria Pastick Jares da. Avaliação do desempenho da PCR em tempo real utilizando insumos nacionais em amostras biológicas de pacientes com tuberculose extrapulmonar. 2019. Dissertação (Mestrado em Biocências e Biotecnologia em Saúde) — Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Quando o bacilo infecta outros órgãos e/ou sistemas do hospedeiro há o desenvolvimento da TB extrapulmonar (TBE). As limitações de sensibilidade no diagnóstico convencional da TBE, determina a necessidade de implementar técnicas moleculares como, a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real com insumos importados (qPCR-I), que tem demonstrado rapidez, boa sensibilidade e especificidade, porém, com o custo ainda muito elevado para ser utilizada nos países pobres. Neste contexto o Instituto de Biologia Molecular da Fundação Oswaldo Cruz do Paraná teve a iniciativa de produzir, insumos nacionais para serem utilizados na qPCR (qPCR-N). O presente estudo tem como objetivo otimizar e avaliar o desempenho da qPCR-N para a detecção do *Mtb* em amostras de sangue, urina e outros líquidos obtidos de indivíduos com tuberculose extrapulmonar (TBE) e indivíduos "Sem TB". Trata-se de um estudo em 103 amostras de 43 pacientes do estado de Pernambuco. Para otimização, avaliação e comparação dos testes moleculares qPCR-N e qPCR-I), foi avaliado o limite de detecção em água, plasma, leucócitos, urina e outros líquidos (OL), com curva de diluição de 10ng/μL a 100ag/μL. Das 103 amostras 56 foram diagnóstico final "Sem TB" e 47 amostras foram "TB extrapulmonar". Entre os teste para qPCR-N e qPCR-I foram considerado positivas as amostras com Ct, respectivamente, até 34, e até 33. Avaliando o desempenho da qPCR-N e da qPCR-I, utilizando como padrão-ouro a cultura, o diagnóstico clínico, diagnóstico final e/ou resposta ao tratamento foram obtidas sensibilidades de 78.72% e 88.71%, respectivamente, e especificidades de 40.43% e 100%. Verificou-se a importância realizar, quando possível, a qPCR-N no maior número de amostra do indivíduo, sobre tudo no caso de TBE. A qPCR-N apresentou um bom desempenho para auxiliar o diagnóstico da TBE, principalmente com maior número de amostras clínicas.

Palavras-chave: Tuberculose extrapulmonar. Diagnóstico. PCR em tempo Real. Insumos nacionais.

COSTA, Rayssa Maria Pastick Jares da. Evaluation of real-time PCR performance using national inputs in biological samples from patients with extrapulmonary tuberculosis. 2019. Dissertation (Masters in Biosciences and Biotechnology in Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease (M) caused by *Mycobacterium tuberculosis*. When the bacillus infects other organs and/or host systems, extrapulmonary TB (ETB) develops. As sensitivity limitations in the conventional diagnosis of TBE, it determines the need to implement molecular techniques such as the Real Time Polymerase Chain Reaction with inputs (qPCR-I), which has demonstrated speed, good sensitivity and specificity, however, with the cost is still too high to be used in poor countries. In this context, the Instituto de Biologia Molecular da Fundação Oswaldo Cruz do Paraná took the initiative to produce national inputs to be used in qPCR (qPCR-N). The present study aims to optimize and evaluate the performance of qP for the detection of Mtb in samples of blood, urine and other fluids obtained with extrapulmonary tuberculosis (TBE) and "Without TB". study in 103 samples from 43 evaluation patients from Pernambuco. For optimization, comparison of OL and dosocyte molecular tests (qPCR-N and qPCR-I), the detection limit was evaluated in water, plasma, leuk, urine and other liquids (), with dilution curvature from 10ng/ μ L to 100ag/ μ L Of the 103 samples, 56 were final diagnoses "No TB" and 47 samples were "Extrapulmonary TB". with Ct, respectively, 34, and diagnosis 33. Performance evaluation of q CR-N and P.P.-O diagnosis/diagnostic response, using diagnosis. % and 88.71%, respectively, and specificities of 40.43% and 100%. Veri It was possible to perform, when possible, the qPCR-N n0 with the largest number of samples of the individual, especially in the case of TBE. qPCR-N performed well to aid in the diagnosis of TBE, especially with a greater number of clinical samples.

Key words: Extrapulmonary tuberculosis. Diagnosis. Real-time PCR. National inputs

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|--------------------|---|----|
| Figura 1- | Estimativa de casos de tuberculose extrapulmonar novos e incidentes no mundo | 21 |
| Figura 2 - | Microscopia eletrônica da bactéria <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . | 24 |
| Figura 3 - | Mapa do cromossomo circular do <i>M. tuberculosis</i> H37Ra | 26 |
| Figura 4 - | Gráfico da amplificação na PCR em tempo real. | 38 |
| Figura 5 - | PCR em tempo real utilizando sonda TaqMan® | 39 |
| Figura 6 - | Representação da separação dos leucócitos e plasma presentes no sangue periférico com Ficoll Histopaque® após centrifugação | 50 |
| Figura 7 - | Representação do protocolo de extração e purificação de DNA | 52 |
| Figura 8 - | Curva de diluição com cepa de referência do <i>M. tuberculosis</i> utilizando Água-MiliQ | 54 |
| Figura 9 - | Curva de diluição com cepa de referência do <i>M. tuberculosis</i> utilizando plasma, PBMC, urina e outros líquidos biológicos | 55 |
| Figura 10 - | Gráfico de amplificação da curva de DNA de <i>M. tuberculosis</i> diluído em água Milli-Q® | 60 |
| Figura 11- | Curva de diluição com plasma, leucócitos, urina, líquido pleural e LCR com os respectivos valores de Ct de cada ponto que compõe a curva. | 62 |
| Figura 12 - | Varição dos Cts das amostras com “Tuberculose extrapulmonar” e “sem Tuberculose” e utilizando o qPCR-N com alvos IS6110. | 64 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tabela 1 - | Análise comparativa entre os principais métodos de diagnóstico para TBE. | 32 |
| Tabela 2 - | Análise comparativa dos custos de cada teste e número de bacilos detectados entre os principais métodos de diagnóstico para TBE | 33 |
| Tabela 3 - | Reagentes utilizados na reação de qPCR-N, seguindo as especificações descritas por Barletta e colaboradores. (2014), e na qPCR-I acordo com os parâmetros utilizados em Santos et al. (2018). | 56 |
| Tabela 4 - | Curvas de diluição com Água Milli-Q®, plasma, leucócitos, urina e Líquido Pleural com os respectivos valores de Ct de cada ponto que compõe a curva utilizando a qPCR-I e a qPCR-N | 62 |
| Tabela 5 - | Tabela comparativa do desempenho da qPCR Nacional e qPCR Importada em 103 amostras de 43 indivíduos analisado através do Kappa. | 66 |
| Tabela 6 - | Tabela desempenho da qPCR Nacional e qPCR Importada em 103 amostras de 43 indivíduos, comparado com Padrão de Referência Composto para todas as amostras. | 67 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| AIDS | - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| a. C. | - Antes de Cristo |
| ag | - Atograma |
| BAAR | - Bacilo Álcool-Ácido Resistente |
| BCG | - Bacilo Calmette e Guérin |
| BK | - Bacilo de Koch |
| BRICS | - Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul |
| CEP | - Comitê de Ética em Pesquisa |
| CMTB | - Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| CNCT | - Campanha Nacional Contra a Tuberculose |
| Ct | - <i>Cycle Threshold</i> |
| Cq | - <i>Ciclo de quantificação</i> |
| DOTS | - Tratamento diretamente observado |
| DNA | - Ácido Desoxirribonucleico |
| dNTP | - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados |
| d.C. | - Depois de Cristo |
| E | - Especificidade |
| EDTA | - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético |
| fg | - Fentograma |
| Fiocruz | - Fundação Oswaldo Cruz |
| H ₂ O | - Óxido de Hidrogênio (água) |
| HIV | - Vírus da Imunodeficiência Humana |
| IAM | - Instituto Aggeu Magalhães |
| IBM-PR | - Instituto de Biologia Molecular do Paraná |
| IC | - Intervalo de Confiança |
| ILTB | - Infecção latente pelo <i>M. tuberculosis</i> |
| IS | - Sequências de inserção |
| kb | - Quilobase |
| LIE | - Laboratório de Imunoepidemiologia |
| LJ | - Löwenstein-Jensen |
| MNT | - Micobactérias não-tuberculosas |

| | |
|-------------------|---|
| MgCl ² | - Cloreto de magnésio |
| min | - Minuto |
| mL | - Mililitro |
| µL | - Microlitro |
| <i>Mtb</i> | - <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| NaOH | - Hidróxido de Sódio |
| NTC | - <i>Non Template Control</i> traduzido em: Controle sem modelo |
| ng | - Nanograma |
| ORF | - Região Aberta de Leitura |
| OMS | - Organização Mundial de Saúde |
| PAS | - Ácido para-amino salicílico |
| PE | - Pernambuco |
| pb | - Pares de Base |
| PCR | - Reação em Cadeia da Polimerase |
| PBMC | - <i>Peripheral blood mononuclear cell</i> traduzido em: Células mononuclear do sangue periférico |
| PPD | - Derivado proteico purificado |
| pg | - Picograma |
| pH | - Potencial de Hidrogênio |
| qPCR | - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real |
| qPCR-N | - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real com insumos nacionais |
| qPCR-I | - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real com insumos importados |
| PPD | - Derivado Proteico Purificado |
| PNB | - Ácido para-nitrobenzóico |
| PCR | - Reação em Cadeia da Polimerase |
| RIF | - Rifampicina |
| REDE-TB | - Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose |
| RPM | - Rotação por minuto |
| S | - Sensibilidade |
| SNC | - Sistema Nervoso Central |
| SNT | - Serviço Nacional de Tuberculose |

| | |
|--------|---|
| SNP | - <i>Single nucleotide polymorphism</i> traduzido em: Polimorfismo de nucleotídeo único |
| Sinan | - Sistema de Informação de Agravos de Notificação |
| SUS | - Sistema Único de Saúde |
| TB | - Tuberculose |
| TBE | - Tuberculose Extrapulmonar |
| TBP | - Tuberculose Pulmonar |
| TB-MDR | - Tuberculose Multidroga Resistente |
| TCH | - Hidrazida do ácido tiofeno 2-carboxílico |
| TT | - Teste Tuberculínico |
| UTI | - Unidade de Tratamento Intenso |
| ZN | - Ziehl-Neelsen |

SUMÁRIO

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL | 18 |
| 2.1 | O histórico da tuberculose | 18 |
| 2.2 | Epidemiologia | 20 |
| 2.3 | Agente etiológico | 23 |
| 2.3.1 | <i>Genoma do <u>Mycobacterium tuberculosis</u></i> | 25 |
| 2.4 | Transmissão | 27 |
| 2.5 | Tuberculose extrapulmonar | 28 |
| 2.5.1 | <i>Tuberculose Ganglionar</i> | 29 |
| 2.5.2 | <i>Tuberculose Pleural</i> | 29 |
| 2.5.3 | <i>Tuberculose Miliar</i> | 29 |
| 2.5.4 | <i>Tuberculose Ostearticular</i> | 30 |
| 2.5.5 | <i>Tuberculose Meningoencefálica</i> | 30 |
| 2.6 | Métodos de diagnóstico da tuberculose | 31 |
| 2.6.1 | <i>Baciloscopia</i> | 33 |
| 2.6.2 | <i>Cultura</i> | 34 |
| 2.6.3 | <i>Teste tuberculínico</i> | 35 |
| 2.6.4 | <i>Exame Histopatológico</i> | 35 |
| 2.6.5 | <i>Testes moleculares</i> | 36 |
| 2.6.5.1 | <u>PCR em tempo real</u> | 37 |
| 2.6.5.2 | <u>Xpert® MTB/RIF</u> | 40 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 43 |
| 4 | HIPÓTESE | 44 |
| 5 | PERGUNTA CONDUTORA | 45 |
| 6 | OBJETIVO | 46 |
| 6.1 | Objetivo geral | 46 |
| 6.2 | Objetivos específicos | 46 |
| 7 | PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS | 47 |
| 7.1. | Desenho do estudo | 47 |
| 7.2. | Caracterização da área e população de estudo | 47 |
| 7.3. | Caracterização dos grupos de estudo | 48 |
| 7.4. | Cálculo amostral | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 7.5. Considerações éticas | 48 |
| 7.6. Padrão-ouro | 49 |
| 7.7. Critérios de inclusão | 49 |
| 7.8. Critérios de exclusão | 49 |
| 7.9. Coleta e processamento de amostras biológicas | 49 |
| 7.10. Culturas em meio Löwestein-Jensen a partir das amostras biológicas | 51 |
| 7.11. Extração de DNA | 52 |
| 7.12. 7.12 Padronização da técnica de qPCR-N e da curva de diluição com DNA extraído de cepa de referências do <i>M. tuberculosis</i> (H37Ra) | 53 |
| 7.13. Parâmetros da qPCR-I para comparação com qPCR-N | 55 |
| 7.14. Condições da PCR em tempo real utilizando insumos nacionais (qPCR-N) | 56 |
| 7.15. Análises estatísticas | 58 |
| 8. RESULTADOS | 59 |
| 8.1. 8.1 Avaliação do limite de detecção de DNA do <i>M. tuberculosis</i> diluído em água Milli-Q® através da qPCR testada com os insumos nacionais | 59 |
| 8.2 Apresentação dos valores de Cts (Cycle threshold) dos experimentos realizados com as curvas de diluição de DNA genômico de <i>M. tuberculosis</i> utilizando insumos nacionais e importados em Água Milli-Q® e em amostras biológicas de sangue (plasma e PBMC), urina, líquido pleural e LCR | 60 |
| 8.3 Comparação do Ct do IS6110 do DNA do <i>M. tuberculosis</i> da qPCR com os insumos nacionais e com insumos Importados, em amostras biológicas de indivíduos “Sem TB” e com “TB Extrapulmonar | 62 |
| 8.4 Desempenho dos testes de qPCR-I e qPCR-N em 103 amostras. | 66 |
| 9. DISCUSSÃO | 68 |
| 10. CONCLUSÃO | 77 |
| REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO | 78 |

| | |
|--|------------|
| APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido | 89 |
| APÊNDICE B - Ficha clínica de pesquisa de tuberculose | 92 |
| ANEXO A – Parecer substanciado do comité de ética e pesquisa – IAM/FIOCRUZ | 94 |
| ANEXO B – Cts obtidos para amostras do grupo “Sem Tuberculose” (negativas para detecção de <i>M. tuberculosis</i>) utilizando a qPCR com insumos nacionais e importados | 101 |
| ANEXO C – Cts obtidos para amostras do grupo “Tuberculose extrapulmonar” (positivas para detecção de <i>M. tuberculosis</i>) utilizando a qPCR com insumos nacionais e importados | 104 |

1 INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa, que tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Geralmente transmitido por via aérea, o bacilo atinge os alvéolos pulmonares onde pode tanto seguir se multiplicando nesse local e causar a tuberculose pulmonar (TBP) ou ainda se disseminar por vias linfática ou hematogênica, assim, atingindo e infectando outros órgãos, que não o pulmão, causando a tuberculose extrapulmonar (TBE) (LERNER et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Atualmente, a TB é considerada um problema de saúde pública que atinge severamente 30 países, os quais apresentam as maiores taxas de acometimentos por essa doença e o Brasil está entre esses países (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018; BRASIL, 2017; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018).

A incidência de TB no mundo, em 2017, foi em torno de 10 milhões de casos. Dentre esses casos a TBE atingiu entre cerca de 900 mil e 1,5 milhões de pessoas em todo mundo dependendo da região catalogada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018). No Brasil, no ano de 2018, a incidência foi de 34,8 casos por 100 mil habitantes, e entre esses casos de TB, 72.788 foram novos (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019; BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018; BRASIL, 2017).

Em 2018, Pernambuco (PE) apresentou coeficientes de incidência (47,1 casos / 100 mil habitantes) e mortalidade (4,5 óbitos / 100 mil habitantes) maiores do que os valores obtidos no país (respectivamente, 34,8 casos e 2,2 óbitos / 100 mil habitantes). Tendo destaque a capital de PE, Recife, que obteve a maior taxa de mortalidade (8,3 óbitos / 100 mil habitantes) quando comparada com todas as capitais do Brasil (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019; BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018;

BRASIL, 2017). Dentre os casos de TB em Pernambuco, registrados na plataforma digital do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) entre os anos de 2015 a 2018, cerca de 3.000 casos foram de TBE. Entre os tipos de maior frequência dessa doença estão: ganglionar periférica, miliar, meningoencefálica e óssea (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2019).

Os métodos diagnósticos comumente usados para a TBE incluem a baciloscopia, prova tuberculínica, o exame histopatológico (de fragmento de tecido

lesionado) e cultura (SOUZA et al., 2013). O teste tuberculínico (TT) apresenta dificuldade em distinguir se o resultado do indivíduo está relacionado à vacina BCG (Bacilo Calmette e Guérin), TB doença ou latente, o que pode resultar em falso-positivos, e, conseqüentemente, baixa especificidade do teste (BRASIL, 2014; BENTO et al., 2011).

O exame histopatológico necessita de amostras mais invasivas. Outra desvantagem do método é a semelhança histológica de lesões granulomatosas, presentes na TB, como também em outras doenças infecciosas, como é o caso do grupo das micobactérias não-tuberculosas (MNT). Essa identificação pode induzir o médico a iniciar uma terapêutica inadequada, uma vez que os tratamentos são distintos para os dois tipos de infecções: TB e outras micobacterioses (PUROHIT; MUSTAFA, 2015; BRASIL, 2010).

Também existem limitações nos métodos bacteriológicos (baciloscopia e cultura) rotineiros de diagnóstico para a TB. A baciloscopia apesar de ser um exame de fácil realização, apresenta baixa sensibilidade, detectando a presença do bacilo quando existem 5.000 bacilos / mililitro de amostra, além de não diferenciar o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e o grupo de micobactéria atípica. Sendo a TBE uma forma paucibacilar da doença, este exame tem pouca chance de detectar o bacilo (BENTO et al., 2011; PUROHIT; MUSTAFA, 2015).

A cultura, por sua vez, é definida como o padrão-ouro para detecção de *M. tuberculosis*, requerendo um mínimo de 10 bacilos / mililitro. Todavia, o crescimento dessa bactéria se dá, em média, de 3 a 4 semanas, podendo necessitar de até oito semanas, quando é confirmado o resultado. Essa demora pode prejudicar o diagnóstico e tratamento precoces do paciente com TB (BRASIL, 2008; MELLO et al., 2014).

Recentemente, um novo método com tecnologia molecular, o GeneXpert MTB/RIF (baseada em Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real e automatizado), foi implantado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da tuberculose pulmonar utilizando amostras de escarro. Este teste tem a capacidade de detectar o DNA do *M. tuberculosis* e a resistência à rifampicina de indivíduos suspeitos provenientes dos serviços de saúde do SUS de regiões de alta endemicidade da doença, o que inclui o estado de Pernambuco. Porém, apesar desta tecnologia permitirum resultado mais rápido do que os métodos convencionais, a

manutenção desta ferramenta para o SUS requer altos custos públicos, visto que este equipamento e seus insumos são importados, além do que seu desempenho em amostras extrapulmonares ainda não está claro na literatura (BRASIL, 2013; LIMA et al., 2017).

Portanto, tornou-se necessário o desenvolvimento de técnicas mais específicas, sensíveis, rápidas e de menor custo (BENTO et al., 2011). Entre as várias técnicas moleculares atualmente aplicadas no diagnóstico da TB, a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) apresenta um bom desempenho na detecção dos fragmentos de DNA, pois realiza um monitoramento em tempo real de todos os ciclos através da detecção e quantificação da fluorescência liberada em cada ciclo da reação ao atingir o limiar da fase exponencial, o *Cycle Threshold* (Ct), momento em que é possível determinar a quantificação da fluorescência proporcional à síntese da região alvo (BRASIL, 2010; CAUSSE et al., 2011; OLIVEIRA; MIRANDA, 2010; SANTOS et al., 2013).

A qPCR utilizando a sonda TaqMan, possui elevada sensibilidade como também alta especificidade por permitir identificar um alvo como o IS6110 (que tem alta especificidade ao complexo *M. tuberculosis* e com mais de 25 repetições nos genomas desse grupo). Para reduzir os custos com essa técnica, o presente estudo padronizou uma PCR em tempo real com insumos nacionais (qPCR-N), os quais foram elaborados e produzidos no Instituto de Biologia Molecular da Fundação Oswaldo Cruz do Paraná (IBMP/Fiocruz — PR) utilizando como base os princípios de Barletta e colaboradores. (2014) (OLIVEIRA; MIRANDA, 2010; WANG et al., 2019).

Portanto, esse trabalho, que faz parte de um projeto maior intitulado “Desenvolvimento, avaliação e validação de um kit molecular baseado em PCR em tempo real com tecnologia nacional para o diagnóstico da tuberculose”, e visa avaliar o desempenho da técnica molecular baseada em PCR em Tempo Real utilizando insumos nacionais, como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico laboratorial da tuberculose extrapulmonar (TBE), em amostras de sangue, urina e outros líquidos biológicos. Portanto, esse estudo visa contribuir com diagnóstico mais eficiente, de menor custo e precoce, que certamente interferirá na cadeia de transmissão da TB colaborando com a eficiência do programa de controle da tuberculose no Brasil.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 O histórico da tuberculose

Os relatos mais antigos de casos de tuberculose (TB) definem a sua ocorrência desde a antiguidade, a mais de 5.000 anos a. C, em que foram identificados o acometimento vertebral da doença em múmias egípcias, também denominada de “Malde Pott”, sendo também reconhecido a presença do DNA do *Mtb* nesses restos mortais (MACIEL et al., 2012). Pesquisadores descreveram a presença dessa doença em várias partes do mundo ao longo do tempo o que pode ser justificado por ser disseminada por via aérea, permitindo atingir uma maior parte da população (NOGUEIRA et al., 2012; ROSEMBERG, 1999).

No final do século XVIII, com o início da revolução industrial e o aumento da urbanização, a TB se disseminou pela Europa e ganhou a denominação de “peste branca” (ROSEMBERG, 1999; SÃO PAULO, 2019). No século XIX a TB começou a ganhar mais notoriedade no Brasil atingindo a população mais pobre que se amontoava nos cortiços, tornando-se a principal causa de morte nessa população. Porém o governo da época adiou o combate à essa moléstia, por atingir uma população com menor poder aquisitivo, e preferiu atuar contra a febre amarela, uma doença que prejudicava as políticas de imigração do Império e, conseqüentemente, os negócios do país como a exportação de café (PINHEIRO, 2016).

Em 1819, a patologia relacionada à TB começou a ser elucidada por René Théophile Hyacinthe Laennec, que descreveu sinais físicos e conceitos da doença seja em forma pulmonar ou extrapulmonar. No entanto, a busca pela etiologia da doença ainda continuou a ser pesquisada até a descoberta de Hermann Heinrich Robert Koch que apresentou demonstrações do bacilo da tuberculose (posteriormente, nomeado de *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilo de Koch), identificando e descrevendo a origem infecciosa da doença. No final do século XIX, Koch desenvolveu a “substância tuberculínica”, que foi aperfeiçoada para colaborar no diagnóstico da TB, atualmente chamado de teste tuberculínico (DANIEL, 2006).

Tendo em vista os desafios da TB como um problema de saúde pública não sóno Brasil como também no mundo, os pesquisadores Albert Calmette e Camille Guérin investiram no desenvolvimento de uma vacina contra a TB, nomeada como BCG (Bacille Calmette-Guérin), e na primeira metade do século XX, a vacinação com a BCG se tornou uma das formas de controle da TB indicada pela Organização

Mundial de Saúde (OMS). Mas a busca por um tratamento que pudesse eliminar a infecção em organismos com tuberculose ativa perdurou até o desenvolvimento de quimioterápicos eficazes no combate ao *M. tuberculosis* por Jorgen Lehmann e Gerhard Domagk que descobriram, respectivamente, o ácido para-amino salicílico (PAS) e isoniazida (ALMEIDA, 2012; DANIEL, 2006).

No Brasil, a vacinação com a BCG em recém-nascidos começou a ser implementada em 1927, após a criação da Liga Brasileira Contra a Tuberculose e da Liga Paulista Contra a Tuberculose, em 1899. Ambas atuaram na profilaxia e tratamento da TB que estavam vigentes na época, com medidas de educação sanitária, e criação de locais, como preventórios e dispensários, para tratamento dos pacientes acometidos com a doença. No entanto, o poder público ficou ausente desse controle de TB até o início do século XX. Oswaldo Cruz, o Diretor Geral de Saúde Pública vigente na época, declarou a necessidade das autoridades sanitárias em combaterem a doença, implementando o Plano de Ação Contra Tuberculose o qual fez uso de condutas terapêuticas e profiláticas. Todavia não obteve grande repercussão, e em seguida, houve a criação da Inspetoria de Profilaxia da Tuberculose, colaborando na profilaxia, diagnóstico e tratamento dessa enfermidade (MACIEL et al., 2012).

Em 1941, surgiu no Brasil o Serviço Nacional de Tuberculose (SNT), e em 1946 foi criada a Campanha Nacional Contra a Tuberculose (CNCT), que constituíram políticas públicas que tiveram como objetivo promover ações de controle da TB no país com medidas como descentralização dos serviços e uniformidade das ações de saúde, além de ampliar a estrutura hospitalar do país. Com a descoberta da estreptomicina, a pirazinamida, a isoniazida, a rifampicina e o etambutol como medicamentos utilizados até o momento no tratamento dessa enfermidade houve um impacto positivo reduzindo a taxa de mortalidade da mesma, assim como foi capaz de reduzir a transmissão (MACIEL et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2012).

Tendo em vista que a TB foi declarada pela OMS um problema emergencial de saúde pública, em 1999 foi fundado o Plano Nacional de Controle da Tuberculose, no qual incluiu a estratégia de Tratamento diretamente observado (DOTS), prioritária nos países que contém 80% dos casos de Tuberculose no mundo. Essa estratégia implica em que os pacientes continuem seus tratamentos para TB até a melhora clínica. Para isso essa é composta por: políticas de mobilização de recursos a favor

de planos de

ação e mobilização social, diagnóstico bacteriológico de casos, tratamento padronizado e supervisionado, fornecimento dos medicamentos e monitoramento dos casos por um sistema de avaliação. Dessa forma, reduzindo a taxa de abandono ao tratamento e as taxa de óbitos por TB, assim como, impedindo a multidroga resistência (BRASIL, 2011; ROSEMBERG, 1999).

O DOTS foi aperfeiçoado com a estratégia Stop-TB/OMS que incluiu outras frentes no combate à TB como o fortalecimento do sistema de saúde, melhorando as políticas de saúde. Outra meta dessa nova estratégia abordou a necessidade de capacitar e promover pesquisas que envolvessem o programa de controle, além de desenvolver novos diagnósticos, tratamentos e vacinas para a TB (BRASIL, 2011).

Em 2017, foi desenvolvido o Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose o qual foi implementado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose baseado em estratégias indicadas pela OMS para atingir metas de redução dos números de casos e da mortalidade ocasionada pela TB até 2035. As estratégias desse plano envolve três pilares: prevenção e cuidados com os pacientes acometidos pela doença, prática e desenvolvimento de políticas e sistema de apoio aos pacientes e intensificação da pesquisa e inovação apoiando organizações como a Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose (REDE-TB), reunindo pesquisadores em parceria para implementar esse terceiro pilar no Brasil (BRASIL, 2017; BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018).

2.2 Epidemiologia

A tuberculose é considerada um problema de saúde pública que acomete diversos países, sendo apontada pela OMS a doença de agente único que provoca mais óbitos no mundo. Cerca de 30 países foram responsáveis pela alta taxa de TB, compondo 90% dos casos no mundo, e o Brasil estava na posição de 20^a lugar em 2015 (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018; BRASIL, 2017; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020).

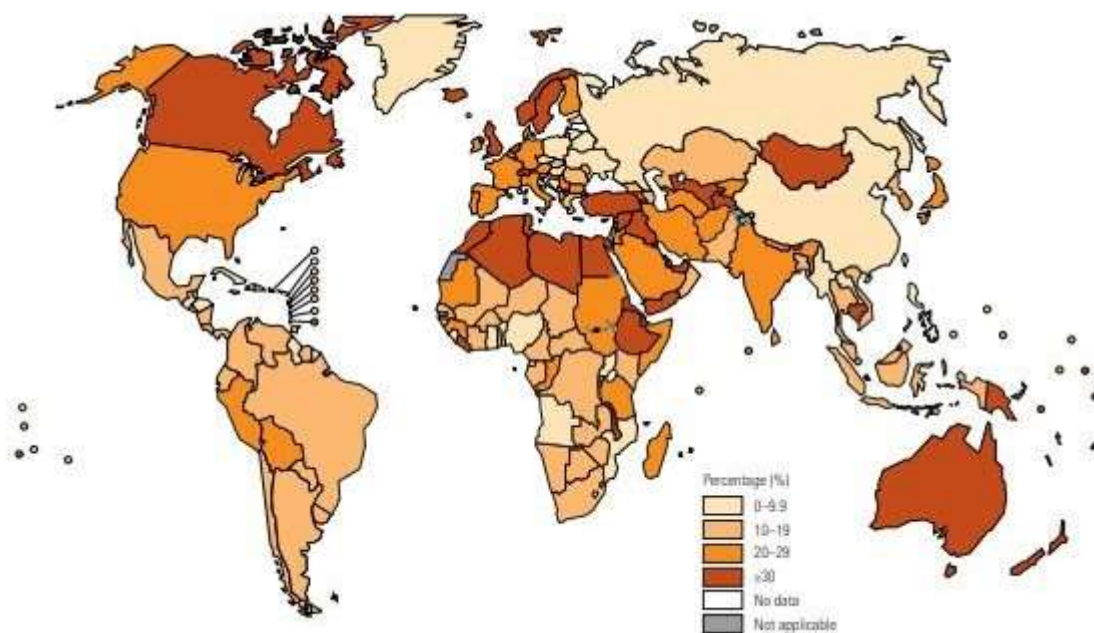
Em 2019, a incidência de TB no mundo foi estimada em 10 milhões de casos, o equivalente a 130 casos novos a cada 100.000 habitantes, além de uma estimativa de 1,2 milhões de mortes de pessoas HIV-negativas e 208.000 mortes de pessoas HIV-positivas. A faixa etária mais afetada foram adultos (≥ 15 anos) ocupando em torno de 90% dos casos, e quanto ao gênero ocorreram 63% de casos de TB em homens

e meninos, indicando que essa doença tem afetado mais o gênero masculino (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020).

A taxa de incidência de TB caiu mundialmente, sendo a redução cumulativa de 2015 a 2019 de 9% (de 142 para 130 novos casos por 100.000 habitantes), que foi insuficiente para atingir 20% da redução entre os anos de 2015 e 2020. A taxa de mortalidade por TB no mundo também vem caindo com uma redução cumulativa de 14% entre 2015 e 2019, porém não atingiu a meta de 35% de redução entre 2015 e 2020 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020).

Ainda no panorama mundial, em 2019, a tuberculose extrapulmonar (TBE) compôs 16% dos 7,1 milhões de pessoas acometidas pela TB. Essa taxa variou entre as Regiões Ocidental do Pacífico da OMS com 8% e do Mediterrâneo Oriental da OMS com 24% dos casos, sendo a taxa das Américas de 15% de casos de TBE novos e recidivantes. Essas taxas variantes e suas respectivas localizações podem ser observadas na Figura 1. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020)

Figura 1: Estimativa de casos de tuberculose extrapulmonar novos e recidivantes no mundo em 2019.



Legenda: Países marcados com suas respectivas porcentagem de cargas de TBE

Fonte: Organização Mundial da Saúde (2020)

No Brasil, em 2019, ocorreram a notificação de 73.684 casos novos de TB e

a incidência foi de 54,7 casos por 100 mil habitantes e, em 2018, um número de óbitos de 4.490, com um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos para cada 100 mil habitantes. Esse valor aumentou quando comparado com o ano de 2016 que apresentou um coeficiente de 2.1 óbitos para cada 100 mil habitantes (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2020; BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019; BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018).

Quanto aos estados do Brasil com maior número de incidência de TB no ano de 2019, os que mais se destacaram foram Pernambuco, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro com, respectivamente, 4.576 casos novos, 4.701 casos novos e 11.139 casos novos. Desses mesmos estados, no Rio de Janeiro e em Pernambuco também ocorreram os maiores coeficientes de óbitos com, respectivamente, 4,3/100 mil habitantes e 4,0 /100 mil habitantes (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2020; BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018; BRASIL, 2017).

Já no ano de 2018, Pernambuco obteve 4.611 casos novos de TB, com taxa de incidência de 48,4/100 mil habitantes e, em 2017, a mortalidade foi de 4,6 casos para cada 100 mil habitantes, respectivamente. Sendo notado que esses dois últimos resultados em Pernambuco excedem ao obtido nacionalmente com taxa de incidência e mortalidade de 36,2 e de 2,2 casos para cada 100 mil habitantes, respectivamente. Na capital (Recife), em 2018, obteve-se 1.385 casos novos de TB, e taxa de incidência 84,6/100 mil habitantes e, em 2017, coeficiente de óbito de 8,4/100 mil habitantes. Tendo Recife a maior taxa de mortalidade (6,3/100 mil habitantes) entre todas as capitais do Brasil, em 2018. De acordo com Pedro et al. (2017) a elevada incidência de TB apresenta relação com desigualdades socioeconômicas como precariedade da infraestrutura e habitação para os moradores da região, portanto esses fatores juntamente com o bem-estar social e a educação são primordiais para reduzir o impacto da TB na região (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2020; BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019; BRASIL, 2020).

As capitais Recife, Manaus e Rio de Janeiro, durante o ano de 2017, também se destacaram com as maiores incidências de Tuberculose (de respectivamente, 104,7, 88,5 e 85,5 casos por 100 mil habitantes), com uma situação em que 70,4% delas representam uma taxa que supera a registrada no país (33,5 casos por 100 mil habitantes). Outro fator alarmante inclui que o Recife apresentou a maior taxa de mortalidade entre todas as capitais brasileiras, registrando um coeficiente de 6,4

óbitos por 100 mil habitantes. Esses aspectos alertam o governo para a necessidade de atenção ao cenário atual do Brasil, principalmente nessas capitais. (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018; BRASIL, 2017).

Em Pernambuco, entre os anos de 2015 a 2019, foram registrados na plataforma digital do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) 29.255 casos de tuberculose de origem pulmonar e extrapulmonar, dentre estes cerca de 15% são de TBE. Durante o ano de 2019 ocorreu a maior taxa incidência de TB com 6.169 ocorrências, destas 1.035 casos foram de TBE. Sendo observado um aumento em relação aos anos anteriores, como em 2018, que foram registrados 5.946 casos, e desses 894 foram de TBE. (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2020).

Dentre os casos de TBE em Pernambuco, em 2019, em ordem decrescente de frequência ocorreram: 333 casos de ganglionar periférica, 278 casos de pleural, 55 casos de meningoencefálica, 88 casos de miliar e 48 casos de óssea. No ano de 2018, esses valores eram menores e os casos mais recorrentes de TBE foram os tipos: ganglionar periférica com 290 casos, pleural com 221 casos, miliar com 81 casos, meningoencefálica com 65 casos e óssea com 33 casos (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2020).

2.3 Agente etiológico

A família Mycobacteriaceae é formada pelo gênero *Mycobacterium* composto pelos principais microrganismos causadores da TB, sendo os mais adaptados aos humanos o *Mycobacterium tuberculosis* e o *M. africanum* os quais pertencem a um grupo denominado de complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) que também é composto por outros patógenos adaptados a animais: *M. bovis*, *M. bovis* - Bacille Calmette-Guérin (BCG), *M. microti*, *M. tuberculosis* subespécie *caprae* e *M. pinnipedii* (COELHO; MARQUES, 2006; FIGUEIREDO et al., 2008; ZIMPEL; GUIMARÃES, 2017).

Os componentes do CMTB representam bactérias que tem similaridade genômica maior que 99,95% de identidade entre as regiões que são alinháveis. A homologia entre sequências do DNA dos espécimes do complexo indicam que tenham surgido a partir de um ancestral comum através de evolução clonal, e diferindo entre si por variações de polimorfismo de nucleotídeo único (*Single*

nucleotide polymorphism - SNP) e áreas de deleções genéticas (COELHO; MARQUES, 2006; ZIMPEL; GUIMARÃES, 2017).

A morfologia das bactérias do CMTB são caracterizadas por terem estrutura em forma de bastonete (Figura 2), serem imóveis e não conterem cápsula como componente, como também não produzem esporos e dificilmente podem ser corados com o método de Gram, apesar de serem consideradas gram-positivas por causa das características da parede celular. Quanto às colônias, os patógenos do CMTB apresentam crescimento lento e coloração creme no meio Lowenstein-Jensen, além de ter aspecto rugoso, seco, acamurçado e não produzir pigmento (COELHO; MARQUES, 2006; ZIMPEL; GUIMARÃES, 2017).

Figura 2: Microscopia eletrônica da bactéria *Mycobacterium tuberculosis*.



Legenda: Imagem de Microscopia eletrônica do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*.

Fonte: Lenharo (2017).

Estes espécimes também são classificados como aeróbios estritos e contêm em sua parede celular lipídeos como glicolípido dimicolato de trealose, que provoca o crescimento em aspecto agregado dos bacilos tornando a aparência de cordas visíveis em microscópio óptico (exame de baciloscopia), nomeado como fator corda, característica importante para a identificação presuntiva do CMTB (COELHO; MARQUES, 2006; REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE, 2012).

Outro lipídeo importante presente nas espécies que compõem esse complexo

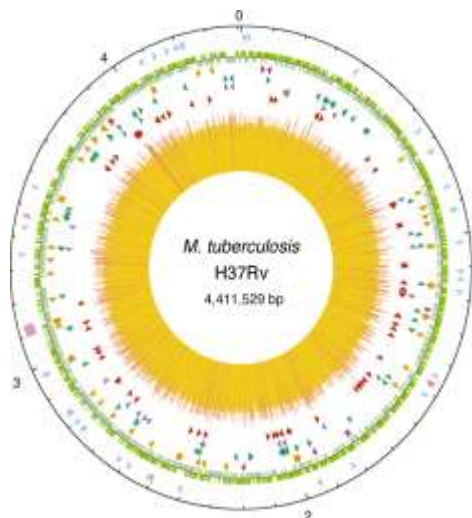
são os ácidos micólicos, que agem hidrofobicamente conferindo resistência ao ressecamento, à agentes químicos, à antibióticos e à descoloração por álcool-ácido após serem corados a quente com fucsina fenicada. Portanto, são os responsáveis por os tornar Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR), particularidade pertencente à coloração de Ziehl-Neelsen, também visualizada através de baciloscopia (COELHO et al., 2007; COELHO; MARQUES, 2006; REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE, 2012; ZIMPEL; GUIMARÃES, 2017).

Esses bacilos preferem permanecer no meio intracelular, podendo sobreviver nos macrófagos dentro do compartimento endossomal ou no citoplasma dessas células que foram ativadas pela resposta imune. Dessa forma esses patógenos são capazes de permanecer em estado de latência por anos dentro do hospedeiro formando granulomas e necrose caseosa, que são efeitos biológicos da reação do organismo hospedeiro à presença dos respectivos conteúdos lipídicos: ácidos micólicos e fosfolípidios (CASTRO-GARZA et al., 2018; COELHO; MARQUES, 2006).

2.3.1 Genoma do *Mycobacterium tuberculosis*

Contendo DNA como material genético, a cepa H37Ra de *Mtb* é a mais amplamente utilizada em laboratórios de pesquisas atualmente, pois possibilita que sua virulência seja mantida em modelos animais, é de fácil manipulação genética e susceptível a drogas. Esse microrganismo é composto por 4.411 quilobases (kb) e cerca de 4000 genes (Figura 3) (DANTAS; FROTA, 2014; NOGUEIRA; BÁFICA, 2012).

Figura 3 - Mapa do cromossomo circular do *M. tuberculosis* H37Ra.



Legenda: Mapa genômico do cromossomo de um *M. tuberculosis* pertencente a cepa H37Ra.
Fonte: Smith (2003).

Desses genes identificados foi observada a associação com a produção de proteínas relacionadas à variedade antigênica, como também, genes que codificam lipídeos, proteínas e carboidratos que compõem a parede celular, atuando como interferente na atividade dos macrófagos, controlando a virulência e latência do bacilo de Koch (BK). Outros genes estão envolvidos com o metabolismo do bacilo, principalmente a produção de enzimas referente ao metabolismo dos ácidos graxos, esse fato pode estar relacionado à eficiência do BK se desenvolver nos tecidos do hospedeiro (CAMPOS, 2006).

O genoma do *Mtb* é rico em sequências de inserção (IS), caracterizadas pelas numerosas cópias no material genético do patógeno, bem como a capacidade de transposição, de movimentação de um local a outro do genoma, provocando polimorfismos posicionais e numéricos capazes de alterar genes de expressão e servir como elemento de estudos epidemiológicos, como é o caso do IS6110 (MCEVOY et al, 2007; RIVERA; CAMARGO, 2014).

A sequência IS6110 foi inicialmente descrita com 1,36 Kb e pertencendo à família IS3. Os elementos dessa família são formados por sequências de leitura que se sobrepõem moderadamente, denominadas orfA e orfB, formando proteínas que inibem a recombinação causada pelas transposases. Dessa forma, a frequência de transposição podem estar relacionadas com as proporções de orfA, orfB e orfAB (região de sobreposição das orfs A e B) (MCEVOY et al, 2007). Essa IS também pode

regular a expressão de genes adjacentes portando-se como promotor, iniciando ou elevando a expressão desses genes. Assim, o IS6110 pode promover alterações no genoma da bactéria, que dependendo da posição de inserção, gera a morte do microrganismo ou permiti um melhor desempenho do mesmo (MILLAN-LOU et al, 2013).

Portanto, o IS6110 é considerado a principal sequência de pares de bases comum aos genomas dos membros do CMTB se repetindo com mais de 25 cópias, com exceção do *M. bovis*-BCG que contém uma cópia ou nenhuma, e estando ausente em outras micobactérias não pertencentes ao grupo CMTB. Essas características apontam a capacidade dessa sequência de inserção ser aplicada em diagnóstico de TB a partir de amostras biológicas (MCEVOY et al, 2007; WANG et al.,2019).

2.4 Transmissão

A tuberculose geralmente é transmitida por via aérea a partir de um indivíduo com doença ativa e com as formas pulmonar, principalmente, e também laríngea. Assim, esses organismos liberam bacilos juntamente com secreções expelidas por tosse, fala ou espirros (BRASIL, 2017).

Esses aerossóis podem permanecer no ar por até 6 horas contendo 1 a 3 bacilos, e a inalação dessas gotículas leva esses microrganismos aos alvéolos pulmonares, onde podem se multiplicar permitindo o desenvolvimento da doença. Outras possibilidades são que os BKs sejam destruídos pelo sistema imunológico, permaneçam em estado de latência no organismo ou serem disseminados para outros órgãos do corpo (BRASIL, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; NOGUEIRA et al., 2012).

Quando em estado de latência o *Mtb* se multiplica lentamente por dias ou até anos, mas o adoecimento pode ser em qualquer momento da vida mesmo estando infectado. Apenas indivíduos com a forma ativa da TB são capazes de transmiti-la, cabendo a esses a liberação desses bacilos. Essa transmissibilidade é medida pela capacidade da pessoa de expelir o bacilo, assim, quando a baciloscopia do escarro é positiva (eliminação de mais de 5.000 bacilos / mL de escarro) se trata de doentes bacilíferos. No caso da baciloscopia ser negativa, e a cultura ser positiva ou negativa, trata-se de um doente não-bacilífero (BRASIL, 2017; FUNDAÇÃO OSWALDO

CRUZ,2008). Dessa forma, estima-se que uma pessoa com TB ativa em estado bacilífero durante um ano em uma comunidade, poderá infectar de 10 a 15 pessoas através do contato intradomiciliar (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008).

É imprescindível que a cadeia de transmissão da TB seja interrompida e para tanto, é necessário a descoberta antecipada desses casos, para iniciar o tratamento precoce que permitirá reduzir gradativamente a liberação dos bacilos para o meio ambiente à níveis insignificantes, o que ocorre, comumente, após 15 dias do início do tratamento (BRASIL, 2008; BRASIL, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

2.5 Tuberculose extrapulmonar

A TB pode acometer tanto o pulmão como também se disseminar por via linfo-hematogênica para qualquer outro órgão ou sistema do corpo caracterizando a TB extrapulmonar. Os bacilos se espalham para esses órgãos podendo provocar lesões granulomatosas, no entanto os sinais e sintomas causados dependem do órgão atingido (BRASIL, 2017; NOGUEIRA et al., 2012).

Há uma maior taxa de TBE em crianças e idosos, além da presença concomitante de outras morbidades como diabetes mellitus, insuficiência renal crônica e, sobretudo, aqueles acometidos pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) causada pela infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) devido ao seu intenso imunocomprometimento (RAMÍREZ-LAPAUSA, MENÉNDEZ-SALDAÑA, NOGUERADO-ASENSIO, 2015).

Nesses casos, pesquisadores notaram maior frequência da TB miliar (definida como a disseminação do BK para diferentes órgãos ao mesmo tempo). Essa forma de TB associa TBP e TBE indicando a necessidade de investigação de ambos os tipos dessa enfermidade quando o paciente estiver infectado pelo *Mtb* e possuir imunodeficiência (BRASIL, 2017; NOGUEIRA et al., 2012).

As principais formas de TBE no Brasil, em 2017, em ordem decrescente de frequência, são: ganglionar periférica, pleural, meningoencefálica, miliar, óssea, pericárdica, peritoneal, renal e ocular. E em Pernambuco, em 2017 e 2018, os tipos de TBE com maior incidência foram as formas ganglionar periférica, pleural, miliar, meningoencefálica e óssea. Esses diferentes modos de apresentação da TB proporcionam sinais e sintomas, que mesmo distintos entre si, são inespecíficos na maioria dos casos, precisando de testes de diagnóstico complementares para definir

a presença dessa morbidade (BENTO et al, 2011; BRASIL, 2017; SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2019).

O diagnóstico da TBE permanece um desafio pela necessidade, na maioria das vezes, de internamento para a coleta de amostras, através de procedimentos invasivos (dependendo da localização do foco da doença) e da dificuldade para a obtenção de volume suficiente para análise. Frequentemente, essas amostras são paucibacilares (pouca carga bacilar) dificultando a identificação do bacilo (RAJ et al., 2016).

2.5.1 Tuberculose Ganglionar

Considerada a segunda forma mais comum de TB extrapulmonar, a tuberculose ganglionar afeta frequentemente gânglios cervicais em crianças e adultos jovens resultante de uma propagação linfohematogênica. Os gânglios apresentam crescimento lento, consistência endurecida, indolor e móvel. É comum a necrose do tecido formando um abscesso no local, como também a involução da lesão ganglionar de forma espontânea ou pela ação do tratamento (KRITSKI; MELLO, 2007; CAMPOS, 2006a).

2.5.2 Tuberculose Pleural

Dentre os tipos de tuberculose extrapulmonar a região mais comumente afetada é a pleura. A disseminação do bacilo para região pleural apresenta três possibilidades: pela ruptura de foco infeccioso na periferia do pulmonar na região subpleural, por contigüidade decorrente de uma lesão pulmonar, ou por via linfohematogênica. A presença do bacilo ou antígeno na região pleural gera um processo inflamatório com recrutamento de células leucocitárias, proporcionando maior acúmulo de líquido, exsudato, para o local. Os aspectos clínicos da TB pleural são caracterizados por dor pleurítica, febre, suor noturno, dispneia e na maioria das vezes ocasiona um derrame unilateral (CAMPOS, 2006a; SEISCENTO; CONDE; DALCOLMO, 2006).

2.5.3 Tuberculose Miliar

A infecção por TB pode ser disseminada para vários órgãos ao mesmo tempo causando a forma de TB miliar ou disseminada, por essa razão a sintomatologia

variada acordo com o órgão acometido. Essa variedade da doença é considerada rara e grave em pacientes pediátricos e imunossuprimidos como a desnutrição grave, o lúpus eritematoso sistêmico e a infecção pelo HIV. Esta forma da TB pode ter atuação semelhante com a sepse, e sua atividade pode estar relacionada com a ingestão de fármacos imunossupressores pelos indivíduos acometidos com a TB difusa, como é o caso de licocorticosteroides (FREIRE et al., 2016).

2.5.4 Tuberculose Osteoarticular

A TB osteoarticular atinge principalmente a coluna vertebral de crianças e idosos, já o envolvimento articular é menos usual e em 50 a 73% dos casos ocorre nas articulações de carga, como quadril e joelho (SEBBEN et al., 2012).

Quando o bacilo atinge a coluna vertebral provoca a destruição da porção anterior do corpo vertebral, podendo progredir para uma deformação em forma de cunha, provocando cifose caracterizando o “Mal de Pott”. Esta variedade de TB comumente se dissemina por via linfohematológica, porém há a possibilidade de contaminação por contiguidade podendo causar o abscesso de tecidos moles adjacentes. Por tanto, esta TB extrapulmonar proporciona sintomas inicialmente insidiosos e de pequena intensidade, em consequência de ser de evolução lenta e decicatrização que pode durar desde meses a anos, até em organismos sensíveis as drogas do tratamento (HISBELLO S. CAMPOS, 2006; HOUSTON et al., 2014; LOPES et al., 2006).

2.5.5 Tuberculose Meningoencefálica

A meningoencefalite tuberculosa é uma importante forma da TBE que acomete o sistema nervoso central (SNC). A vacina BCG ajuda na redução profilática dos números de casos dessa enfermidade, mas em casos de crianças menores de 6 anos e pacientes com imunossupressão, como os pacientes infectados com HIV, há maior probabilidade e adquirir essa doença (BETHLEM, 2012).

Decorrente de disseminação hematogênica, a TBE meningoencefálica, pode formar granulomas na superfície do encéfalo, nas meninges e na medula espinhal, onde os bacilos se multiplicam rompendo o granuloma no espaço meníngeo causando a infecção de *Mtb* no SNC e conseqüentemente inflamação. Assim, acarretando sintomas que variam dependendo do local lesionado, como febre baixa, anorexia,

trombose, hipertensão intracraniana, convulsões, neurológicos inespecíficos (como alterações de humor, cefaléia, apatia e irritabilidade), rigidez da nuca podendo causar um coma ao paciente, caso não seja identificada e tratada (BETHLEM, 2012; CAMPOS, 2006a; THWAITES; VAN TOORN; SCHOEMAN, 2014).

O diagnóstico é feito através da identificação de alterações semelhantes lesões nodulares e sugestivas de infarto em exames de imagem (tomografia computadorizada e ressonância magnética). De toda forma, deve ser feita a confirmação do diagnóstico através de exames laboratoriais para detecção do bacilo como a cultura (BETHLEM, 2012; THWAITES; VAN TOORN; SCHOEMAN, 2014).

2.6 Métodos de diagnóstico da tuberculose

O diagnóstico da TB abrange os sinais e sintomas clínicos do paciente como também os exames complementares bacteriológicos (baciloscopia e cultura), histopatológicos, teste tuberculínico, entre outros, dependendo da forma clínica da TB (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018).

Para estabelecer o diagnóstico mais preciso de TB, em uma área endêmica como o nordeste do Brasil, é necessário correlacionar um conjunto de evidências clínicas, epidemiológicas e sociais além de utilizar exames complementares para identificar o bacilo, ou que indique a infecção pelo mesmo (como em exames imunológicos) (BRASIL, 2017; FERRI et al., 2014; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008). Desde 2014, um novo exame complementar vem sendo implementado pelo Ministério da Saúde, o Gene Xpert MTB/RIF, um método automatizado de qPCR para detectar de forma mais rápida a tuberculose, sobretudo a forma pulmonar (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018)

Nos casos de TB paucibacilar, como nas formas de TBE, o diagnóstico permanece um desafio, tendo muitas vezes que associar critérios clínicos e epidemiológicos à resposta terapêutica específica devido aos exames bacteriológicos de rotina (baciloscopia e cultura) serem geralmente negativos. (BRASIL, 2017; FERRI et al., 2014; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008; RAJ et al., 2016).

Apesar de existirem uma variedade de métodos de diagnóstico para tuberculose, nesse trabalho será dada ênfase aos métodos que são mais utilizados

para investigação dos casos de TBE. A tabela 1 resume os principais métodos de diagnóstico com suas respectivas vantagens e limitações, e a Tabela 2 complementa com as informações de concentração do bacilo na amostra, como também o custo decada teste.

Tabela 1 - Análise comparativa entre os principais métodos de diagnósticos para TBE

| MÉTODO DIAGNÓSTICO | VANTAGENS | LIMITAÇÕES |
|--------------------------|---|---|
| Baciloscopia (ZN) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Simplicidade ▪ Baixo custo ▪ Rapidez | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Baixa sensibilidade ▪ Impossibilidade de identificar a espécie ▪ Incapaz de indicar a viabilidade do bacilo |
| Cultura de Micobactérias | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Baixo custo ▪ Baixa taxa de contaminação ▪ Isolamento do bacilo | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Condições de biossegurança ▪ Habilidade técnica ▪ Incubação longa ▪ Baixa sensibilidade |
| Exame Histopatológico | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Possibilidade de diagnóstico diferencial | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Invasivo ▪ Padrão Inespecífico |
| Teste Tuberculínico | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Simplicidade ▪ Baixo custo | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Falsos-negativos (TB/HIV) ▪ Falsos-positivos(regiões endêmicas) |
| Métodos Moleculares | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Elevada Sensibilidade ▪ Rapidez | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Custo elevado e Habilidade técnica ▪ Falso-positivos, Contaminação ▪ Incapaz de indicar a viabilidade dos bacilos |
| Xpert MTB/RIF | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Elevada Sensibilidade ▪ Rapidez ▪ Resistência à rifampicina | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sensibilidade variada* ▪ Custo elevado |

Fonte: Adaptado pela autora de Araújo e Schindler (2019).

Tabela 2 - Análise comparativa dos custos de cada teste e número de bacilos detectados entre os principais métodos de diagnósticos para TBE

| TESTE | CONCENTRAÇÃO DE BACILOS (N°) | CUSTO |
|------------------------------|---|---|
| BACILOSCOPIA | 5x10 ³ a 1x10 ⁴ bacilos/mL da amostra (BRASIL, 2011). | R\$ 100,25 |
| CULTURA | 10 bacilos por mililitro de amostra (BRASIL, 2011). | R\$5,63 |
| TESTE TUBERCULÍNICO | Não quantifica o N° de bacilos (reação imunológica) | R\$ 10 |
| EXAME HISTOPATOLÓGICO | Não quantifica o N° de bacilos (características histopatológicas) | R\$25,00 |
| qPCR-I | 5fg de bacilos /µL da amostra | ≈R\$250,55 (incluindo kit de extração de DNA) |
| qPCR-N | 5fg de bacilos /µL da amostra | ≈R\$95,00 reais por amostra (valor ainda em ajuste) |
| XPERT MTB/RIF | 5fg de bacilos /µL da amostra | R\$167,41 |

Fonte: Tabela feita pela autora baseado nos estudos de Foundation for innovative New diagnostics (2011)

e Lira et al.(2013). Valores estimados de acordo com o dólar atual, 2020.

2.6.1 Baciloscopia

A baciloscopia é um exame bacteriológico caracterizado por ser simples, rápido e de baixo custo. É capaz de identificar bacilos álcool ácidos resistentes (BAAR) através da coloração de Ziehl-Nielsen, mais comum, sendo mais empregada para o diagnóstico da forma pulmonar da TB em amostras de escarro. É possível ser realizada em outras amostras como: urina, lavados gástrico e brônquico, escarro induzido, materiais de ressecção de biópsia, porém a baixa sensibilidade desse teste nessas amostras torna a cultura obrigatória (BRASIL,2017; PUROHIT; MUSTAFA, 2015; BENTO et al., 2011; BRASIL,2017).

Esse método geralmente é indicado nos pacientes sintomáticos respiratórios, quando há suspeita clínica ou radiológica de TB pulmonar, e no acompanhamento da resposta ao tratamento específico e confirmação da cura. Apesar desses critérios

envolverem principalmente a forma pulmonar, a baciloscopia também pode ser utilizada em amostras biológicas de pacientes com suspeita de TB extrapulmonar (BENTO et al., 2011; BRASIL,2017).

O princípio dessa técnica está baseado na elevada quantidade de lipídios presentes na parede celular das micobactérias, conferindo ao bacilo uma resistência à descoloração feita com álcool-ácido, deixando-os na coloração rosa (BENTO et al., 2011; FERRI et al., 2014). Assim, o resultado desse exame permite definir a presença ou ausência do BK na amostra, e também possibilita quantificar a carga bacilar aproximada. No entanto, este é um método que apresenta baixa sensibilidade, pois exige um mínimo 5.000 a 10.000 bacilos / mL de amostra para que o exame seja considerado positivo. No entanto, em amostras paucibacilares (com poucos bacilos) que são comuns em pacientes com TBE e/ou com imunossupressão há uma grande tendência a resultados falsos negativos (BENTO et al., 2011; PUROHIT; MUSTAFA, 2015).

2.6.2 *Cultura*

A cultura é um método bacteriológico considerado como padrão-ouro para o diagnóstico definitivo de TB (PUROHIT; MUSTAFA, 2015). Através da cultura da amostra é possível isolar, identificar e verificar a viabilidade do BK. (BENTO et al., 2011; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008). Pode ser realizada em meio sólido ou líquido. A leitura do resultado em meio sólido (Löwenstein-Jensen) possibilita uma quantificação do número de *Mtb* através da contagem das colônias (BENTO et al., 2011).

Dentre as vantagens desse teste estão a sua elevada sensibilidade em relação à baciloscopia, pois detecta 10 a 100 bacilos / mL de amostra, possui elevada especificidade (podendo chegar até 98%), permite a identificação da espécie por meio de testes bioquímicos, fenotípicos e moleculares e possibilita a realização do teste de susceptibilidade às principais drogas utilizadas no tratamento anti-TB (BENTO et al., 2011; PUROHIT; MUSTAFA, 2015).

Contudo, as principais desvantagens para a cultura é o tempo necessário para o crescimento dos bacilos, podendo variar de 2 até 8 semanas, retardando a definição diagnóstica e o início do tratamento, além da necessidade de condições de biossegurança apropriadas (em laboratório de nível de biossegurança 3) e técnicos

de laboratório especializados (LEE, 2015; PUROHIT; MUSTAFA, 2015).

2.6.3 *Teste tuberculínico*

O teste tuberculínico (TT) é baseado no princípio de reação celular de hipersensibilidade tardia e, assim, é realizado para diagnosticar infecção pelo *Mtb*. Inocula-se um antígeno, o derivado proteico purificado (PPD) específico do *Mtb* em região intradérmica da pele do terço médio do antebraço esquerdo do paciente. As células do sistema imunológico tardio (linfócitos T) causam uma resposta ao agente externo causando um processo inflamatório que provoca a migração de células mononucleares (que já haviam tido um primeiro contato com o antígeno) provocando uma região endurecida no local da pele em que ocorreu a aplicação. Após 48 até 96 horas da aplicação é realizada a leitura na pápula formada no antebraço e para sua interpretação segue-se as normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 2014; MENZIES; PAI; COMSTOCK, 2007; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013; STARKE JR; COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES, 2014)

Este teste é mais utilizado para o diagnóstico de infecção latente pelo *M. tuberculosis* (ILTB) em adultos e crianças, mas também auxilia em casos de TB ativa em crianças (BRASIL, 2011). No entanto, esse teste apresenta baixa reatividade em pessoas com a imunidade comprometida co-infecção TB e HIV, que apresentam deficiência da imunidade celular podendo levar a resultados falso-negativos (PASSALENT et al., 2006).

Por outro lado, a reatividade ao teste tuberculínico é influenciada por fatores como a presença de vacina recente com BCG e em portadoras de micobactérias não tuberculosas (MNT), sendo incapaz de distinguir os resultados positivos destes indivíduos com os portadores de TB ativa ou TB infecção latente ou de moradores de regiões endêmicas (por terem contato prévio com o *Mtb*). Assim, há a possibilidade de identificação de resultados falsos-positivos, reduzindo a sensibilidade do método (BRASIL, 2014; LEE, 2015; PUROHIT; MUSTAFA, 2015).

2.6.4 *Exame Histopatológico*

O exame histopatológico é aplicado em casos de suspeita de TB extrapulmonar. O material para biópsia é coletado do órgão acometido, a fim de verificar a presença de lesão granulomatosa, característica de processo inflamatório, mas não específica da tuberculose, podendo estar presente em outras doenças

crônicas, precisando da identificação de BAAR na amostra para auxiliar o diagnóstico da TB. (BRASIL, 2017; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008)

Apesar de em países endêmicos os resultados do histopatológico com presença de células gigantes de Langhan serem considerados como TB, ainda é preciso a confirmação da presença do *Mtb* através da cultura, e em seguida da confirmação da espécie por testes bioquímicos ou moleculares (BENTO et al., 2011; BRASIL, 2011; PUROHIT; MUSTAFA, 2015).

É necessária a confirmação do agente causador da lesão, pois a prevalência de infecção por MNTs está crescendo de 4% até 50% dependendo da região do mundo, e esse grupo também tem a propriedade de ser BAAR, assim como, a semelhança na caracterização histológica das lesões ocasionadas pelas micobactérias tuberculosas e MNTs, sendo importante estabelecer a distinção entre esses grupos, uma vez que utilizam tratamentos distintos. Este também é um exame que para obtenção da amostra requer um método invasivo, precisando de ambiente apropriado, e podendo formar fístulas (BENTO et al., 2011; BRASIL, 2011; PUROHIT; MUSTAFA, 2015).

2.6.5 Testes moleculares

As limitações dos métodos convencionais de diagnóstico da TBE como a cultura, baciloscopia, testes tuberculínicos e exames histopatológicos indicam a necessidade de um método que possa auxiliar nessa investigação como os métodos moleculares principalmente aqueles derivados do princípio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (CAUSSE et al., 2011; FERRI et al., 2014)

A técnica da PCR foi desenvolvida em 1980, e possibilita a amplificação de uma sequência específica do DNA (CAUSSE et al., 2011). O princípio se baseia na síntese de sequências específicas do DNA delimitadas por dois oligonucleotídeos sintéticos (iniciadores ou *primers*), estes que se ligam a fita de DNA opostas. Quando a enzima DNA-polimerase se liga ao DNA, inicia a formação de um molde da porção do DNA através da adição de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) resultando na amplificação do DNA *in vitro* (CAUSSE et al., 2011; LIMA et al., 2009; GUARINES, 2015).

Com a descoberta da PCR novos métodos de diagnóstico baseados nesse princípio de amplificação de ácidos nucleicos como a PCR em Tempo Real (qPCR)

e teste Xpert® MTB/RIF que permitem maior variabilidade da acurácia, confiabilidade, reprodutibilidade e diagnósticos precoces, foram propostos como métodos auxiliares para o diagnóstico da TB (BRASIL, 2010; CAMPOS, 2006b; MONTENEGRO, 2013).

2.6.5.1 PCR em tempo real

A PCR em tempo real ou PCR em tempo real quantitativa (qPCR) foi inicialmente descrita em 1993, pelo pesquisador Higuchi e seus colaboradores, onde montaram um sistema automatizado de monitoramento em tempo real de todos os ciclos através da detecção da fluorescência liberada na reação em cada ciclo, sendo essa a principal característica que a distingue da PCR convencional (OLIVEIRA; MIRANDA, 2010).

Dessa forma, a PCR em tempo real (qPCR) permite detectar e quantificar os fragmentos de DNA ou RNA a cada ciclo, determinando os ciclos na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial, também denominado de *Cycle Threshold* (Ct). Neste ponto é possível determinar a quantificação da fluorescência proporcional a síntese da região alvo (NOVAIS, 2004; OLIVEIRA; MIRANDA, 2010).

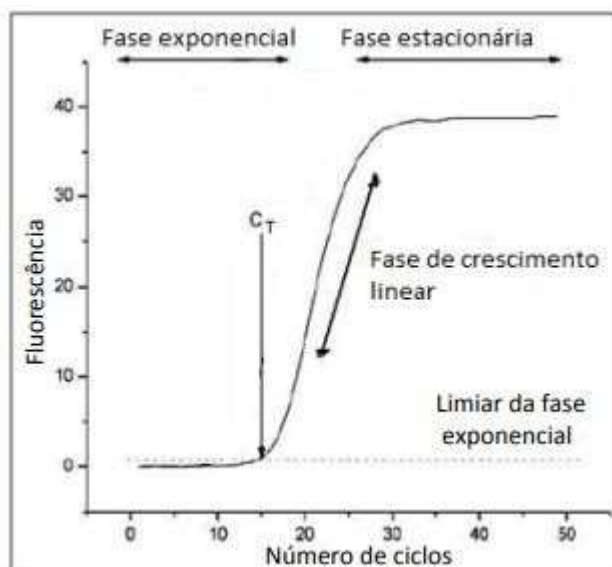
A qPCR com a sonda TaqMan utiliza uma pequena quantidade de DNA, onde uma sonda se acopla a uma região do genoma do micro-organismo. Quando a enzima *Taq* DNA polimerase hibridiza a região marcada pela sonda é liberada uma fluorescência, que aumenta diretamente em relação a quantidade de ácido nucléico ou ácido ribonucleico amplificado (NOVAIS, 2004; OLIVEIRA; MIRANDA, 2010).

Para a realização da qPCR é necessário um termociclador (capaz de realizar as oscilações de temperatura necessárias para realizar os ciclos da técnica). Este equipamento contém uma unidade óptica capaz de detectar os diferentes comprimentos de ondas emitidos pelos compostos fluorescentes, e o resultado dessa detecção está integrado com um computador acoplado a um Software específico (OLIVEIRA; MIRANDA, 2010).

Este Software gera um gráfico para a reação, composto pelas fases: de crescimento exponencial, de crescimento linear e estacionária (Figura 4). Sendo a primeira fase caracterizada por sua especificidade e precisão, enquanto na fase linear os produtos da reação estão iniciando sua degradação, e na última fase há um elevado nível de degradação indicando o final da reação. Assim, o aumento da

fluorescência identificada é diretamente proporcional à quantidade de produto específico amplificado, mas esse fator está melhor expresso na análise da fase exponencial (OLIVEIRA; MIRANDA, 2010).

Figura 4 – Gráfico da amplificação na PCR em tempo real



Legenda: Esse gráfico representa a posição da fases exponencial. Anterior a essa fase se encontra a fase linear e posterior está a fase estacionária. Também é possível observar uma linha tracejada denominada de *Threshold* e a interseção dessa linha com o início da fase exponencial é denominada de *Cycle Threshold* (Ct).

Fonte: Oliveira e Miranda (2010).

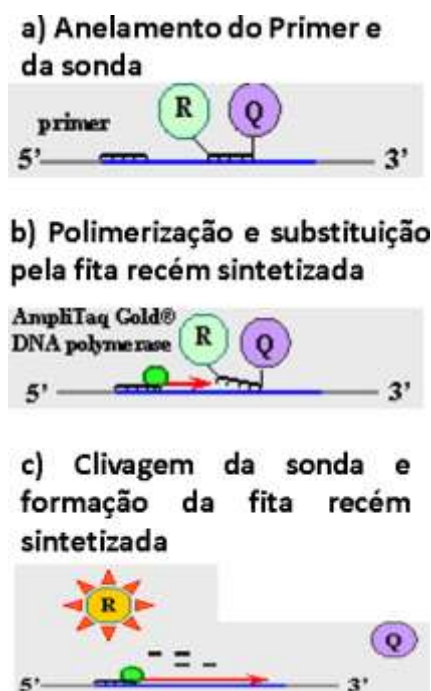
Os compostos fluorescentes mais utilizados são o SYBR® Green e a sonda TaqMan®. O SYBR® Green é considerado menos específico, pois é um corante intercalante de DNA se ligando a qualquer parte do DNA em fita dupla que surge durante a reação, incluindo dímeros de *primers* ou regiões que não são alvos. E a TaqMan® é uma sonda de uma sequência específica de uma região alvo no genoma (NOVAIS, 2004; OLIVEIRA; MIRANDA, 2010).

A sonda TaqMan® apresenta na extremidade 5' um fluorocromo *reporter* (fluoróforo que emite a fluorescência), e na extremidade 3' um fluorocromo *quencher* (molécula capaz de captar a fluorescência emitida pelo *reporter* e dissipar como calor ou luz), devido à proximidade entre esses fluorocromos a fluorescência é suprimida pela transferência de energia do *Reporter* para o *Quencher*. Dessa forma, inicialmente o *primer* e a sonda se hibridizam com a fita-molde na sequência alvo a qual são complementares. Em seguida, a enzima Taq DNA polimerase detecta a presença da sonda e é hidrolisada pela ação exonucleotídica 5'-3' dessa enzima. Assim, a clivagem

da TaqMan® permite a separação e, conseqüentemente, o aumento da distância entre o *Quencher* e o *Reporter*. Toda a atuação da sonda TaqMan está ilustrada na figura 5 (BUSTIN et al., 2009; OLIVEIRA; MIRANDA, 2010; USA, 2019).

Como resultado dessa reação há o aumento exponencial da fluorescência a cada ciclo realizado na qPCR até que essa ultrapasse o limiar *Threshold*, sendo esse ciclo denominado de ciclo *Threshold (Ct)* ou ciclo de *quantificação (Cq)* expressos em forma de gráfico no monitor acoplado ao termociclador. Portanto, essa técnica permite identificar e quantificar regiões específicas do genoma do *M. tuberculosis*, mesmo quando a quantidade de ácidos nucleicos for baixa (BUSTIN et al., 2009; OLIVEIRA; MIRANDA, 2010; USA, 2019).

Figura 5 - PCR em tempo real utilizando sonda TaqMan®



Legenda: A imagem “a” mostra o anelamento do primer e da sonda na região alvo específica, composta pelo *reporter* (representado pelo “R”) e pelo *quencher* (“Q”). A imagem “b” mostra o início da polimerização da região alvo em um DNA e início da formação da fita recém-sintetizada em direção à sonda TaqMan. Assim, com a presença dos primers “forward” e “reverse” ligados na região de interesse de amplificação, a Taq polimerase (DNA polimerase) começa a hibridizar a fita de DNA com a adição dos dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados) formando uma fita nova e complementar a essa. E a imagem “c” representa quando a Taq polimerase alcança a região alvo na qual a sonda (TaqMan®) está ligada, ocorrendo o rompimento da ligação entre os dois componentes dessa sonda: repórte (emissor da fluorescência) e quencher (receptor da fluorescência). Dessa forma, o quencher deixa de absorver a fluorescência do repórte já que a distância entre eles aumenta quando deixam de estar ligados entre si. E assim, a fluorescência emitida pelo repórte é liberada a ponto de permitir a detecção pela máquina de qPCR.

Fonte: Adaptada pelo autor a partir de USA (2019).

A tecnologia da qPCR permite elevada sensibilidade e especificidade, não

necessitando de processamento da amostra na pós-qPCR o que reduz o risco de contaminação. Mas esse é um método que gera um alto custo tanto pelo equipamento utilizado como pelos insumos necessários. Também é importante ressaltar que esta é uma técnica viável para automatização como está ocorrendo com o GeneXpert que é um equipamento que automatiza a qPCR e é usado para diversas doenças oncológicas ou infecciosas, incluindo para a detecção da tuberculose (OLIVEIRA; MIRANDA, 2010; TEIXEIRA et al., 2017).

2.6.5.2 Xpert MTB/RIF

O avanço da tecnologia e da biologia molecular, levaram ao desenvolvimento do sistema GeneXpert MTB/RIF, aplicado para uma variedade de doenças infecciosas e oncológicas. Utilizando esse sistema, o teste Xpert MTB/RIF foi criado como um método automatizado de detecção do *M. tuberculosis* e também de triagem de resistência bacteriana a fármacos (rifampicina), através da amplificação de ácidos nucleicos por reação em cadeia polimerase (PCR) em tempo real. Este método é capaz de realizar não só a PCR em tempo real como também prepara as amostras clínicas através da purificação e concentração dos ácidos nucleicos para a amplificação e detecção pela PCR das sequências específicas do mesmo (BRATS, 2011; TEIXEIRA et al., 2017).

Esse é um método automatizado (com computador e software próprios) que processa desde a preparação das amostras até amplificação e detecção do DNA do *Mtb*. Para isso são utilizados cartuchos contendo todos os elementos que serão necessários na reação como tampões, reagentes liofilizados e soluções de lavagem (BRATS, 2011; TEIXEIRA et al., 2017).

Assim, a reação da PCR em tempo real (qPCR) identifica sequências do DNA do bacilo, mais especificamente o gene *rpoβ* do *M. tuberculosis*, como também, inclui cinco sondas capazes de se complementar a regiões que determinam resistência à rifampicina no gene *rpoβ*. A reação da qPCR neste teste é caracterizada por utilizar dois pares de *primers* para duas reações seguidas, em que na primeira PCR utiliza um primer menos específico que amplificar até áreas não-alvo para gerar mais produtos de DNA, já o segundo primer é mais específico e amplifica regiões internas ao primeiro produto (BRATS, 2011).

A partir de 2014, o Xpert® MTB/RIF foi disponibilizado na rede pública de saúde

do Brasil, já que atualmente a OMS indica esse tipo de teste molecular para o diagnóstico de algumas formas de TB (incluindo casos de TBE), por possibilitar maior rapidez e precisão no diagnóstico em relação a exames de cultura e baciloscopia. Dentre os estados que o receberam estava incluído Pernambuco (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018; PIATEK et al, 2013).

Dentre as desvantagens do GeneXpert está o custo de compra de equipamentos necessários para realização do teste como a aquisição da máquina para a análise dos dados (valor unitário de R\$ 35.875,00), além dos reagentes, dos insumos e dos cartuchos, assim chegando a um custo total dos equipamentos, em 2013, de R\$ 4.161.500,00. Também devem ser levados em consideração os custos com a manutenção por meio de calibração anual, realizada por um profissional treinado e com um equipamento de calibração especializado (BRATS, 2011; PINTO et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2017).

Dessa forma, o custo médio para o diagnóstico por caso identificado com o Xpert MTB/RIF é de R\$ 35,57 que é maior quando comparado com a baciloscopia (R\$ 14,16). Segundo Teixeira e colaboradores (2017), tendo em vista esses valores para a incorporação do GeneXpert MTB/RIF seria necessário um investimento de R\$ 147 milhões em cinco anos, a partir de 2015, para esse teste ser difundido 100% no Brasil (BRATS, 2011; PINTO et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2017).

Essa técnica permite aumentar a especificidade da reação, porém atualmente Organização Mundial da Saúde define que esse teste é indicado principalmente para uso com amostras de expectoração, sendo recomendado para apenas algumas formas específicas de TBE. Este fato deve-se a utilização do mesmo em amostras extrapulmonares (paucibacilares) como líquidos cefaloraquidiano, pleural, pericárdico entre outros, apresentando sensibilidade mais baixa, principalmente em amostras cujos exames bacteriológicos (baciloscopia e cultura) foram negativos, característica comum de formas paucibacilares da doença, dificultando sua utilização no diagnóstico da TB extrapulmonar (LIMA et al. 2015; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018; PUROHIT; MUSTAFA, 2015).

A baixa sensibilidade e alto custo do Xpert MTB/RIF, bem como as deficiências presentes nos demais testes de diagnóstico trouxeram a necessidade de um teste diagnóstico de TBE mais rápido, sensível, específico e de baixo custo. Tendo isso em

vista, o IBM / Fiocruz - PR desenvolveu insumos nacionais em parceria com o presente estudo está sendo realizada a otimização e avaliação desse teste baseado em qPCR (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018; PUROHIT; MUSTAFA, 2015).

3 JUSTIFICATIVA

A tuberculose continua sendo considerada pela OMS um problema de saúde pública de grande impacto na população mundial por ser uma doença de fácil disseminação, mesmo possuindo formas de prevenção e tratamento específico. O Brasil está entre os países que apresentam maior carga de TB. Portanto, presente estudo avaliará a metodologia baseada em qPCR com insumos nacionais que poderão auxiliar no diagnóstico da TB ao diagnóstico e início do tratamento específico. Nesse contexto, se faz necessário o diagnóstico precoce de todas as formas clínicas de TB e a integração de iniciativas inovadoras para aprimorar o controle da doença. No entanto, os exames convencionais como cultura e baciloscopia apresentam limitações que interferem no diagnóstico do indivíduos como a demora na obtenção do resultado e baixa sensibilidade, respectivamente, fazendo-se necessária

a pesquisa de novos ensaios para o diagnóstico da TB.

Os métodos moleculares baseados em qPCR já vem sendo testado com insumos importado para o diagnóstico da TBE como é o caso do teste Xpert MTB/RIF. No entanto, a baixa sensibilidade em amostras extrapulmonares pela baixa quantidade de bacilos e o alto custo para compra dos reagentes indicam a necessidade de um método mais barato e sensível, que possa ser implementado no SUS e em países pobres.

Diante das dificuldades diagnósticas expostas esse estudo avaliará a metodologia baseada em qPCR com insumos nacionais - qPCR-N - (reagentes produzidos pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná / Fundação Oswaldo Cruz) que provavelmente auxiliarão ao diagnóstico mais rápido, sensível, específico e de baixo custo (não foi possível fazer o cálculo detalhado do custo da qPCR-N em virtude da ausência de informações que só serão obtidas após a patente). Esta ferramenta certamente também possibilitará um início do tratamento específico e precoce, interferindo na cadeia de transmissão, e dessa forma, levando à diminuição da morbimortalidade por TB e oferecendo subsídios ao Programa Nacional de Controle da TB.

Além disso, serão testadas amostras não invasivas, que poderão ser coletadas a nível ambulatorial como sangue e urina podendo evitar, em determinados casos, a realização da punção, mais invasiva, de líquidos como pleural e cefalorraquidiano.

4 HIPÓTESE

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) com insumos nacionais apresenta desempenho semelhante ou superior à qPCR com insumos importados em amostras de sangue, urina e outros líquidos biológicos para o diagnóstico da tuberculose extrapulmonar.

5 PERGUNTA CONDUTORA

O desempenho da PCR em tempo real (qPCR) com insumos nacionais é similar ou diferente da qPCR com insumos importados *in house* em diferentes amostras biológicas (sangue, urina, biópsia e outros líquidos) de indivíduos com tuberculose extrapulmonar?

6 OBJETIVO

6.1 *Objetivo geral*

Avaliar o desempenho da técnica molecular baseada em PCR em Tempo Real utilizando insumos nacionais e comparar com a importada para o diagnóstico da tuberculose extrapulmonar (TBE).

6.2 *Objetivos específicos*

- a) Otimizar o sistema baseado em PCR em tempo real utilizando insumos nacionais para identificação do IS6110 presente no genoma do *Mycobacterium tuberculosis*;
- b) Avaliar o desempenho da qPCR utilizando insumos nacionais (qPCR-N) em amostras de sangue, urina e outros líquidos de indivíduos com TB extrapulmonar;
- c) Comparar sensibilidade e especificidade da qPCR-N com a qPCR com insumos importados (qPCR-I) *in house*.

7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

7.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo analítico, prospectivo não concorrente do teste de diagnóstico molecular para tuberculose, da fase I-II de avaliação de teste diagnóstico da classificação de Sackett e Haynes (2002).

7.2 Caracterização da área e população de estudo

Foram selecionadas amostras de sangue, urina e outros líquidos de indivíduos de ambos os sexos, idades variadas com suspeita inicial de TB extrapulmonar de várias formas clínicas (pleural, cutânea, óssea, ganglionar, miliar e outras), provenientes de ambulatórios, enfermarias e Unidade de Tratamento Intenso (UTI) de hospitais pertencentes ao Sistema Único de Saúde do Estado de Pernambuco (SUS/PE).

Foi avaliado um teste de diagnóstico baseado em qPCR com insumos nacionais, realizado no Laboratório de Imunoepidemiologia (LIE), pertencente ao departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ). O diagnóstico e tratamento dos indivíduos foram definidos pelo médico acompanhante dos serviços de saúde.

Ao término das avaliações de desempenho dos testes moleculares nacional e importado, será proposto a elaboração do protótipo/kit molecular e posterior realização de estudo de custo-efetividade. Foi utilizada uma amostra de conveniência considerando 95% de confiança, 80% de poder do teste, com uma Odds Ratio mínima de 2, um percentual de exposição de 20% entre os controles e considerando uma sensibilidade e especificidade de 85% e um erro máximo tolerável de 5% (FLAHAULT et al., 2005). Foi construído um banco de dados no programa SPSS 13.3 e para análise de desempenho do teste foi considerado um nível de significância de 5% e intervalos de confiança de 95%. Também se utilizou o teste qui-quadrado.

Este projeto será continuado com auxílio financeiro conseguido através do Edital UNIVERSAL 2018 do CNPq — Número do Processo:430829/2018, onde os protótipos dos kits serão distribuídos em alguns laboratórios de referência para TB do Brasil para a fase de validação multicêntrica.

7.3 Caracterização dos grupos de estudo

Foram utilizadas amostras biológicas de indivíduos provenientes dos serviços de saúde públicos (SUS) que recebemos no nosso laboratório por demanda espontânea, de acordo com os critérios pré-estabelecidos, agrupadas como segue:

- a) *Amostras de indivíduos com tuberculose extrapulmonar (controle positivo):* Amostras de indivíduos com evidência clínica e/ou epidemiológica de TB extrapulmonar, isolamento do *M. tuberculosis* em amostra clínica através de exame direto ou cultura e/ou resposta ao tratamento específico;
- b) *Amostras de indivíduos sem TB (controle negativo):* Amostras de indivíduos sem TB, que procuraram o serviço de saúde por outra doença, com quadro clínico e laboratorial não compatível com a TB e ausência de contágio com adultos com TB ativa.

7.4 Cálculo amostral

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado no valor preditivo positivo e negativo do teste em Babafemi E.O. (2017). Considerando a proporção do teste e padrão ouro de 1:1, um poder do estudo de 80%, Intervalo de Confiança (IC) 90%, erro alfa de 10%, especificidade em sangue, urina e outros líquidos biológicos, como LCR e Líquido pleural de, respectivamente, 80%, 100% e 100 %, e sensibilidade de sangue, urina e outros líquidos biológicos de, respectivamente de 80%, 70% e 70%, foi calculado um tamanho de amostra de 328.

7.5 Considerações éticas

Todos os indivíduos foram esclarecidos sobre a pesquisa e receberam um termo de livre consentimento (apêndice A) para assinarem, em duas vias, referente à sua participação voluntária na pesquisa. No caso de indivíduos menor de idade ou legalmente incapaz, o seu responsável consentiu para a coleta das amostras biológicas necessárias por escrito através da assinatura no termo de consentimento. As informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais relevantes de cada indivíduo foram registradas em uma ficha clínica pré-elaborada (apêndice B) e depositadas em um banco de dados (software estatístico SPSS v 8.0) para análises estatísticas. O acompanhamento clínico e tratamento destes indivíduos foram

realizados pelos profissionais médicos responsáveis pelos indivíduos nas unidades de saúde que investigaram a existência ou não de tuberculose extrapulmonar. O estudo é parte integrante de um projeto maior intitulado: “Desenvolvimento, avaliação e validação de um kit molecular baseado em PCR em tempo real com tecnologia nacional para o diagnóstico da tuberculose”, aprovado pelo Comitê de Ética (Anexo A) de nº: CAAE: 45739715.7.0000.5190.

7.6 Padrão-ouro

Foi considerado, neste estudo, como padrão ouro um padrão de referência composto (PRC) considerando um conjunto de critérios clínico, epidemiológico e laboratorial compatível com TB extrapulmonar, além resposta evidente ao tratamento específico (LIRA, 2012; ROZALES, 2013).

7.7 Critérios de inclusão

Indivíduos de idades variadas, de ambos os sexos, com suspeita de tuberculose extrapulmonar com possibilidade de coleta de amostras de sangue, urina e/ou outros líquidos, que não tenham iniciado tratamento para tuberculose e que concordaram em participar da pesquisa através da compreensão e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

7.8 Critérios de exclusão

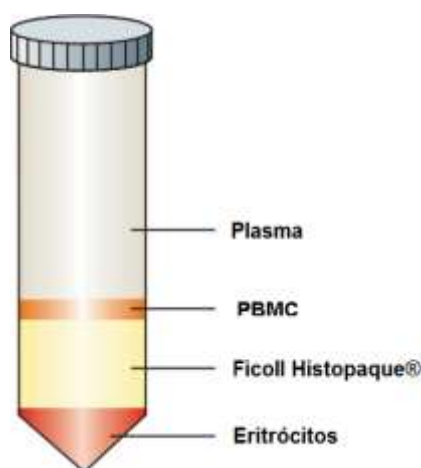
Os indivíduos cujo tratamento para tuberculose já foi iniciado e com impossibilidade clínica de coleta das amostras biológicas utilizadas nesse estudo. Indivíduos que não tenham preenchido a ficha clínica ou termo de consentimento ou que a cultura tenha sido contaminada.

7.9 Coleta e processamento de amostras biológicas

De cada indivíduo foram coletadas as amostras de sangue, urina e/ou outros líquidos dependendo da forma clínica da tuberculose extrapulmonar e as mesmas serão processadas, submetidas à análise microbiológica e molecular (de acordo com as normas do Manual de Bacteriologia da Tuberculose e a análise molecular, segundo o protocolo de Lira et al.,2013.), como segue:

- a) *Coleta do sangue*: Foram coletados 4,5 ml de sangue de cada indivíduo por punção venosa usando tubos (Vacutainer®, Becton and Dickson, England) contendo Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA).
- b) *Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (peripheral blood mononuclear cell – PBMC) e do plasma*: após coleta, em temperatura ambiente, o sangue foi processado utilizando 4,5 ml de solução salina 0,9% e homogenizando a amostra de sangue. Em seguida, a solução resultante foi transferida para um tubo falcon de 15 ml contendo 3 mL de Ficoll Histopaque®, por conseguinte ocorreu uma centrifugação da solução com a amostra a 2.000 RPM por 30 minutos o que resultou na separação dos elementos do sangue (plasma, células mononucleares do sangue periférico — PBMC — e hemácias) como na figura 6, sendo alicotados para extração de DNA dos bacilos apenas o plasma e PBMC de cada amostra de sangue.

Figura 6 — Representação da separação dos leucócitos e plasma presentes no sangue periférico com Ficoll Histopaque® após centrifugação



Legenda: Esquema representativo resultado do método de separação dos componentes do sangue periférico utilizando o Ficoll Histopaque® para gerar um gradiente baseado na densidade dos componentes após a centrifugação. O plasma está representado na primeira camada (em cinza), os PBMC estão representados na segunda (em laranja), o Ficoll Histopaque® está na terceira (em amarelo) e os eritrócitos na quarta (em vermelho).

Fonte: Adaptado de Munoz e Leff (2007) por Araújo e Schindler (2019).

- c) *Urina*: Para coletar a urina, cada indivíduo fez a higienização íntima, desprezando o primeiro jato, posteriormente foram coletadas até 10 ml de

urina, sendo três amostras em dias consecutivos (1ª urina da manhã). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 3.000 RPM por 15 minutos e 1,5 mL de amostra *in natura* foi separado para posterior extração de DNA. O restante da urina foi descontaminada seguindo o protocolo do Método de Petroff modificado, no qual é utilizada solução de NaOH a 4%, com vermelho de fenol como indicador de pH e solução de ácido sulfúrico a 5% como neutralizante. Então, a solução foi centrifugada a 4.000 rotações por minuto (RPM) por 20 minutos. E por fim foi desprezado o sobrenadante e resuspenso com 2 mL de Água estéril. (BARRETO, 2005). Três gotas da amostra final foram semeadas em meio de cultura e o restante foi armazenado à -20°C.

- d) *Outros Líquidos (LCR, líquido pleural e líquido ascítico)*: Foram coletadas pelo médico assistente do serviço de saúde e conservadas em temperatura à 10 °C por no máximo 24 horas até o processamento de extração de DNA e semeadas em meio de cultura.

7.10 Culturas em meio Löwestein-Jensen a partir das amostras biológicas

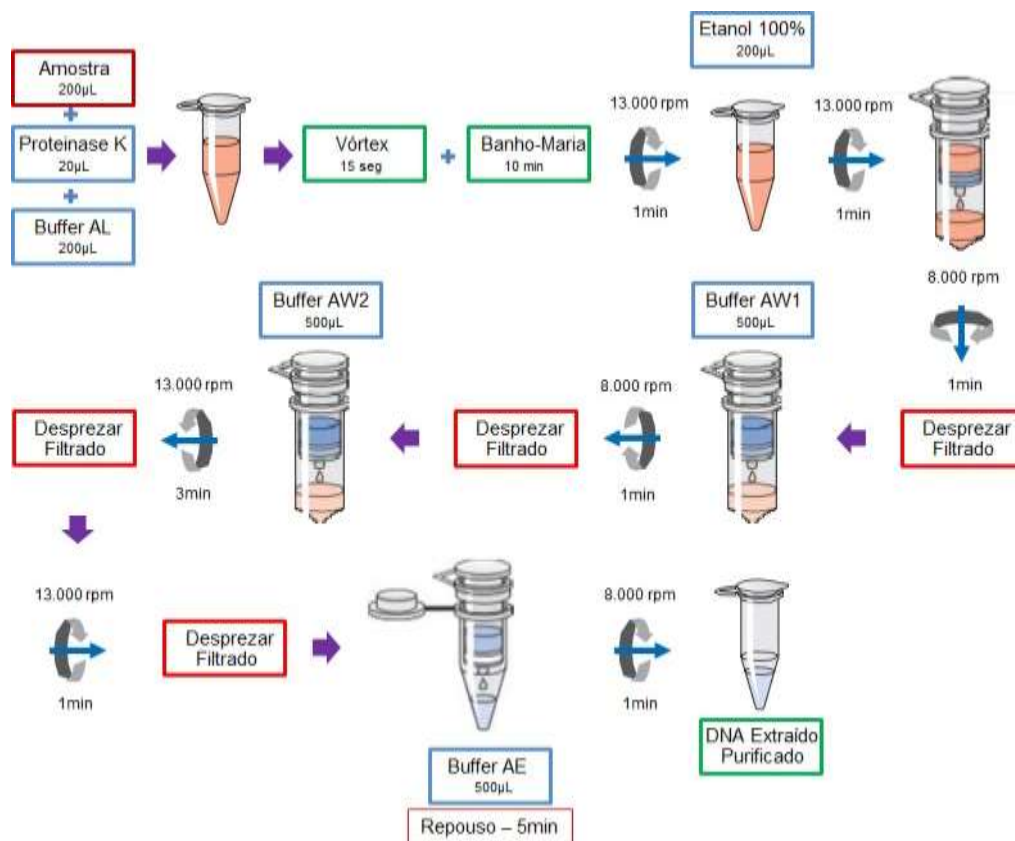
A cultura foi realizada segundo o Manual Nacional de Vigilância da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008). Todas as amostras, exceto as de sangue, foram semeadas, passando por processo de descontaminação apenas as amostras não estéreis. Após a descontaminação, 2 mL de água estéril foram utilizados para resuspenso o material descontaminado. Utilizando pipetas de Pasteur 3 a 4 gotas (0,2 mL) do produto, as amostras foram semeadas em meio Löwestein-Jensen com ácido para-nitrobenzóico (PNB), hidrazida do ácido tiofeno 2-carboxílico (TCH) e em meio Simples (sem droga alguma). Os meios semeados foram armazenados em estufa a 37°C por até 8 semanas, sendo lidos semanalmente até que houvesse crescimento de colônias ou até o fim do prazo. Os meios foram preparados no Laboratório de Imunoepidemiologia do IAM/FIOCRUZ, passaram por testes de esterilidade (estufa a 37°C sem inoculação de amostra) e controle de qualidade do meio (inoculação de cepa de referência H37Ra de *M. tuberculosis*). As espécies de micobactérias foram diferenciadas do complexo *M. tuberculosis* a partir de testes bioquímicos como Teste de inibição de crescimento em meio com PNB, inibição de crescimento em meio com TCH e teste de imunoenensaio cromatográfico do TB Ag MPT64. Este último permite a identificação rápida do complexo *M. tuberculosis*

utilizando o anticorpo monoclonal anti-MPT64 (proteína que foi encontrada apenas no fluido de cultura de cepas do complexo *M. tuberculosis*.) a partir da colônia crescentecultura sólida. Portanto, foi adicionado 100 µl de cultura sólida suspensa em tampão na cavidade do dispositivo; Assim que o teste começar a reagir, será possível observar uma cor se movendo ao longo da janela de resultados localizada ao centro do dispositivo de teste. Por fim, interpretar o resultado do teste em 15 minutos (não interpretar após 15 minutos).

7.11 Extração de DNA

As extrações de DNA do *M. tuberculosis* foram realizadas de acordo com QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), seguindo-se o protocolo do fabricante, como ilustrado na figura 6. Durante ambos os processos de extrações de DNA foram utilizados controles negativos que também foram incluídos nas reações de qPCR, afim de certificar a eficiência desse processo de obtenção de DNA e a eficácia do método molecular.

Figura 7 – Representação do protocolo de extração e purificação de DNA



Legenda: Esquema que representa o processo de extração de DNA de acordo com o protocolo do

kit QIAamp DNA Mini Kit da Quiagen.

Fonte: Adaptado de QIAamp (2016) por Araújo e Schindler (2019).

a) Amostras de sangue, urina e outros líquidos

Para essas amostras foram pipetados 200 µl do Buffer AL, juntamente com 20µl de proteinase K e 200 µl da amostra *in natura*. Em seguida, a amostra foi homogeneizada no vórtex por 15 segundos e incubada em banho-maria a 56 °C por 10 minutos. Após esse tempo, a amostra foi centrifugada à 13.000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados 200 µl de etanol (96 — 100%), novamente agitados no vórtex por 15 segundos e centrifugada à 13.000 rpm por 1 minuto. Quando retirada da centrifuga, a amostra foi transferida para coluna presente no *kit* e submetida a centrifugação de 8.000 rpm por 1 minuto. O tubo coletor foi trocado, após essa centrifugação, foi adicionado 500 µl de Buffer AW1 e submetidos novamente acentrifugação de 8.000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, o tubo coletor contendo o filtrado foi descartado, e então, adicionou-se o Buffer AW2, centrifugando a amostra à 14.000 rpm por 3 minutos. Novamente o filtrado foi desprezado, a amostra foi submetida a 14.000 rpm por 1 minuto, em seguida, foi adicionado à coluna contendo a amostra 200 µl do Buffer AE, e incubou-se a amostra em temperatura ambiente por 5 minutos a fim de concentrar o DNA. Por fim, a amostra passou por uma centrifugação de 8.000 rpm por 1 minuto, guardando o filtrado com a amostra e descartando a coluna.

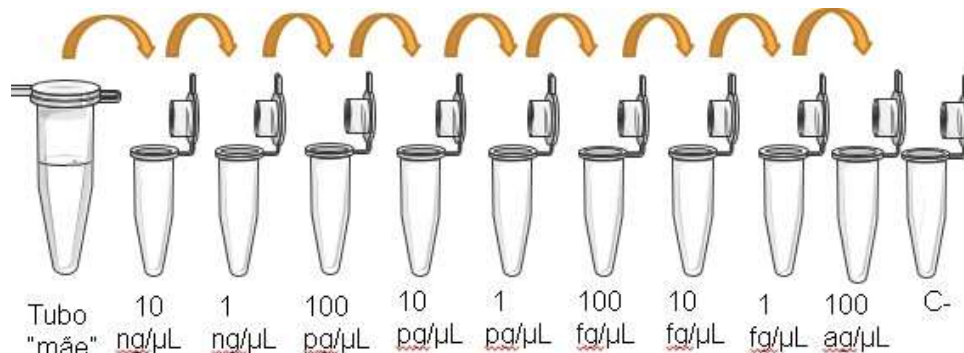
7.12 Padronização da técnica de qPCR-N e da curva de diluição com DNA extraído de cepa de referências do *M. tuberculosis* (H37Ra)

Foi feita uma parceria com o Instituto de Biologia Molecular da Fundação Oswaldo Cruz do Paraná (IBMP/Fiocruz — PR) para a elaboração e produção de insumos nacionais para serem utilizados nas reações de qPCR com uma mistura de qPCR do IBMP (6,66 µl), mistura de oligonucleotídeos (1 µl), amostra 5 µl e água para completar 20 µl de reação, a ciclagem é 10' a 95°C, 40 ciclos de (20" a 95°C e 60" a 60°C). A técnica de qPCR utilizando insumos produzidos nacionalmente pelo IBMP/Fiocruz–PR foi padronizada da seguinte forma: em cada reação substituiu-se um dos reagentes importados, de cada vez, por um reagente produzido nacionalmente. Após a avaliação individual de cada reagente por reação, todos os insumos foram substituídos.

A sensibilidade dos testes foi definida pela amplificação da menor concentração de diluição de DNA marcado com alvo molecular IS6110 quando comparado ao controle negativo da reação (tubo sem DNA). Assim, para essa avaliação detectada através da qPCR utilizando insumos nacionais, foi realizada nesse teste molecular a avaliação da diluição da curva padrão de DNA extraído de cepa de referência de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra), em duas situações:

a) Diluição da curva padrão em água milli-Q®, equivalendo a 10ng/μl até 1fg/μl de DNA do *M. tuberculosis* (Figura 8), obtido da cepa de referência (H37Ra), e avaliada na qPCR com insumos nacionais para a detecção do gene *IS6110* do *Mycobacterium tuberculosis*.

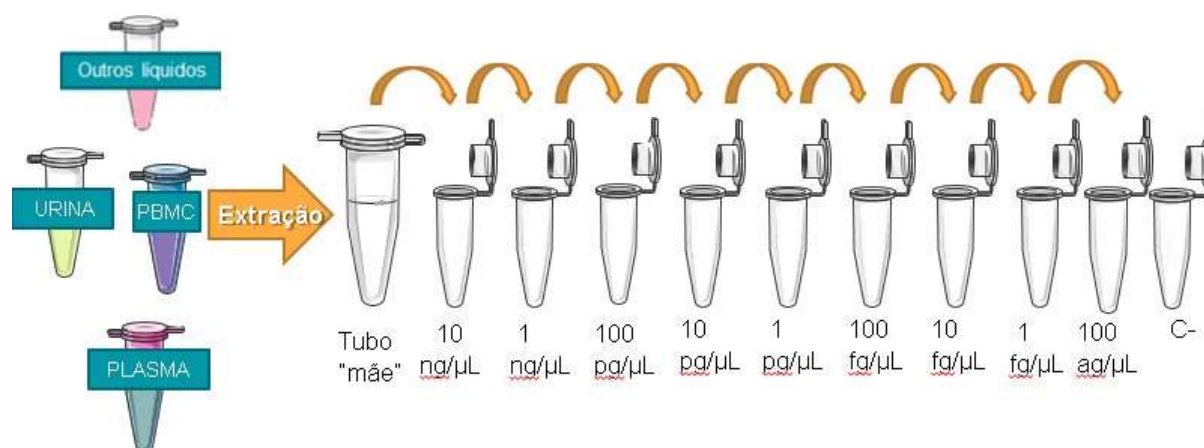
Figura 8- Curva de diluição com cepa de referência do *M. tuberculosis* utilizando Água-MiliQ



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

b) Diluição da curva padrão em amostras biológicas (plasma, PBMC, urina, biópsia e outros líquidos) de indivíduos sabidamente "sadios", equivalendo a 10ng/μl até 1fg/μl de DNA do *M. tuberculosis* (Figura 9), obtido da cepa de referência (H37Ra), e avaliada na qPCR com insumos nacionais para a detecção do gene *IS6110* do *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 9 - Curva de diluição com cepa de referência do *M. tuberculosis* utilizando plasma, PBMC, urina e outros líquidos biológicos



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

7.13 Parâmetros da qPCR-I para comparação com qPCR-N

Foi realizada uma comparação da avaliação dos resultados utilizando a qPCR-N com resultados dos artigos, dissertações e teses existentes, atualmente na literatura, que aplicam a qPCR-I em amostras de sangue, urina e/ou outros líquidos biológicos de indivíduos com suspeita de TBE. Também foi usado para esses fins os resultados internos do laboratório de Imunoepidemiologia com o emprego da qPCR-I provenientes do banco de dados organizado por esse laboratório de acordo com os parâmetros utilizados em Santos et al. (2018), as mesmas amostras foram submetidas tanto a qPCR-I quanto a qPCR-N.

No estudo de Santos et al. (2018) foi utilizado os oligonucleotídeos: TAQM3 (5'-AGGCGAACCTGCCAG-3') e TAQM4 (5'-GATCGCTGATCCGGCCA-3'). A sonda

específica (homóloga à região alvo) utilizada foi a TaqMan 5'-TGTGGGTAGCAGACCTCACCTATGTGTCGA -3' composta por um Reporter, denominado VIC e um Quencher, denominado TAMRA. Durante a qPCR-I as amostras serão submetidas a uma desnaturação inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 15 minutos, em seguida 40 ciclos, à 95°C por 15 segundos para uma desnaturação, e amplificação à 60°C por 1 minuto por um processo de anelamento,

Tabela 3- Reagentes utilizados na reação de qPCR-N, seguindo as especificações descritas por Barletta e colaboradores. (2014), e na qPCR-I acordo com os parâmetros utilizados em Santos et al. (2018).

| qPCR-N | | | qPCR-I | |
|--|--------------|---------|--------------|---------|
| Reagentes | Concentração | Volume | Concentração | Volume |
| Mix 3 | | | | |
| (Tampão, dNTPs, MgCl ⁺² e TaqPolimerase) | ** | 6,66 µL | | 12,5 µL |
| H ₂ O | - | 5,34 µL | - | 0,5 µL |
| Primer M3 (forward) | * | 1 µL | | 1 µL |
| Primer M4 (reverse) | * | 1 µL | | 1 µL |
| Taq MP (sonda TaqMan®) | * | 1 µL | | 1 µL |
| DNA | - | 5 µL | - | 9 µL |
| Total | - | 20 µL | | 25 µL |

Legenda: **O Mix 3 trata-se de um reagente, já pronto e que não pode ser alterado, produzido pela IBMP/Fiocruz — PR contendo Tampão, mix de dNTPs, MgCl⁺² e enzima TaqPolimerase. A concentração do mesmo não foi informada pela instituição responsável pela produção, por fazer parte do Kit IBMP e estar sujeita à patente. *A concentração não foi disponibilizada por fazer parte do Kit IBMP e estar sujeita à patente.

Fonte: Elaborado pela autora, 2018

7.14 Condições da PCR em tempo real utilizando insumos nacionais (qPCR-N)

A partir da utilização dos insumos nacionais produzidos na IBMP/Fiocruz-PR foram realizados testes com a qPCR no Núcleo de Plataforma Tecnológica do IAM/FIOCRUZ, sendo essa técnica baseada nos princípios utilizados por Barletta e colaboradores. (2014), com algumas modificações nas condições da qPCR, como também nas concentrações e volumes dos reagentes, em que o alvo utilizado foi a sequência de inserção IS6110, que é a sequência que mais se repete no genoma

do

M. tuberculosis (0 a 25 cópias), região delimitada pelos oligonucleotídeos utilizando (sequência não disponibilizada por estar sujeita a patente, essa é distinta da sequência usada na qPCR-I). A sonda específica (homóloga à região alvo) utilizada foi a TaqMan (sequência não disponibilizada por estar sujeita a patente, essa é distinta da sequência usada na qPCR-I) - tendo o ROX como referência passiva - composta por um Reporter, denominado FAM e um Quencher, denominado BHQ-1.

Quando a sonda TaqMan® (Taq MP) liga-se à sequência alvo IS6110, e os *primers* delimitam a região de inserção. Dessa forma a Taq DNA polimerase degrada a ligação entre o Reporter e o Quencher pela sua atividade exonuclease 5'- 3', permitindo que Reporter pare de absorver a fluorescência emitida pelo Quencher. A fluorescência liberada é identificada pelo software da máquina 7500 (Applied Biosystems, CA, US).

Durante a qPCR as amostras serão submetidas a uma desnaturação inicial de 95° C por 10 minutos, em seguida, à 95° C por 20 segundos para uma desnaturação, e amplificação à 60 °C por 1 minuto por 40 ciclos de um processo de anelamento, utilizando a proporção por amostra de 6,66 µl do Mix de qPCR do IBMP, 1µl de cada primer e sonda TaqMan® (Taq MP), 5µl de DNA extraído de amostra clínica, e 5,34µl de água mili-Q, completando o volume final de 20µl por amostra.

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

- a) *Controles negativos*: dois controles negativos durante a reação de qPCR com todos os reagentes sem DNA e com água no lugar da adição de amostra (*Non Template Control* — NTC);
- b) *Controles positivos*: Curva padrão utilizada na reação variando de 1 ng, 100 pg, 10pg, 100 fg, 10 fg a 1 fg /µl feita a partir do DNA extraído da cepa de referência de *M. tuberculosis* (H37Ra).
- c) *Controle interno da reação*: O controle interno (18S) foi utilizado para todas as amostras.

Todos os pontos da curva de DNA foram testados em triplicata, exceto os pontos com menor concentração (1fg/ µl) que foram testados em octuplicata. Todas as amostras serão feitas em duplicata e o valor do *threshold* será ajustado de acordo com a média observada entre as duplicatas. Dessa forma, os valores dos Cts foram

determinados considerando as médias dos valores encontrados. O processamento das amostras na qPCR-N e na qPCR-I foram através do sistema Quanti Studio 5 (Applied Biosystems, CA, US). A análise, interpretação e registro dos resultados do qPCR foram obtidos com o auxílio do ABI Prism Software (versão 1.4 e 2.0.4 — Applied Biosystems).

7.15 Análises estatísticas

Foram realizadas análises para determinar sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e precisão do diagnóstico com apresentação dos seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Também realizou-se a análise de concordância entre os testes de diagnósticos utilizando o teste de Kappa e o respectivo teste de qui-quadrado. Foi testada a homogeneidade das distribuições com o teste de Breslow-Day e utilizou-se o teste de Mantel-Haenszel para avaliar a existência de diferenças dos comportamentos (percentuais) das distribuições do qPCR nacional com o importado.

Para os dados contínuos foram avaliados com os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett quanto à suposição de normalidade e de homogeneidade das variáveis envolvidas no estudo. Desta forma, será definindo qual será a abordagem mais adequada (paramétrica ou não paramétrica) para avaliar os dados envolvidos no estudo.

Nas análises das variáveis quantitativas as diferenças de médias para as variáveis independentes serão testadas utilizando Anova seguido do post hoc o teste de Tukey quando observado o pressuposto de homogeneidade. Caso contrário, será utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido do post hoc o teste Fisher. Observando o pressuposto de normalidade a média será avaliada das variáveis envolvidas no estudo com o teste T-Student.

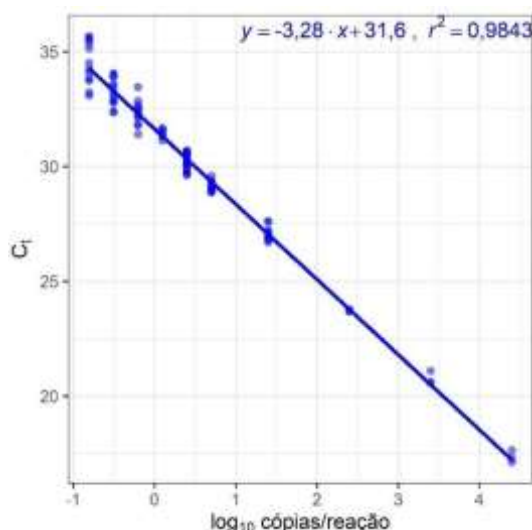
Todas as conclusões serão tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016) e OpenEpi (versão 3.01) foram utilizados na análise e avaliação dos resultados do estudo

8 RESULTADOS

8.1 Avaliação do limite de detecção de DNA do *M. tuberculosis* diluído em água Milli-Q® através da qPCR testada com os insumos nacionais

O limite de detecção da técnica foi de 1fg/μL de DNA diluído em água Milli-Q® com os respectivos reagentes, em concentrações e volumes otimizados (Tabela 3), conforme o observado na figura 10.

Figura 10 - Gráfico de amplificação da curva de DNA de *M tuberculosis* diluído em água Milli-Q®



Legenda: Na figura 10 é possível observa o gráfico formado com a reação de qPCR na curva de diluição com água Mili-Q® com as concentrações em picograma (pg), nanograma (ng), femtomgrama (fg) e presença também de NTC (No template control — controle sem amostra). Os pontos de diluição da curva e o NTC estão demonstrados em cada ponto presente na linha azul, sendo a concentração de DNA do *Mtb* (H37Ra)(CORRIGIR NOS OUTROS LUGARES) inversamente proporcional ao valor de Ct identificado.

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

8.2 Apresentação dos valores de Cts (Cycle threshold) dos experimentos realizados com as curvas de diluição de DNA genômico de *M. tuberculosis* utilizando insumos nacionais e importados em Água Milli-Q® e em amostras biológicas de sangue (plasma e PBMC), urina, líquido pleural e LCR

Cada concentração de DNA obtida através da curva de diluição resultou em um valor de Ct em cada tipo de amostra. Essas foram analisados e comparadas na qPCR-I e qPCR-N em Água miliQ e em amostras de plasma, leucócitos, urina, líquido pleural

e LCR.

Foi possível identificar um limite máximo de detecção de positividade de 1fg/ μ L de *Mtb* que foi semelhante em todos os espécimes biológicos testados. Os Cts, obtidos através da média de três resultados da curva foram nas amostras de água, plasma, leucócitos, urina, líquido pleural e LCR foram de 32, 35, 35, 32, 33 e 34, respectivamente. (Tabela 4 e Figura 11).

A eficiência da técnica de qPCR-N nas amostras testadas nas curvas ficaram altas, estando muito mais próximas de 100%. Na figura 11, percebe-se que a equação da reta só considera os pontos que estão na faixa linear (linha contínua). As concentrações de três pontos da curva com amostra matriz (linha azul) foram comparados com uma curva de diluição em água (linha vermelha), ajudando a corroborar com os resultados obtidos com a matriz.

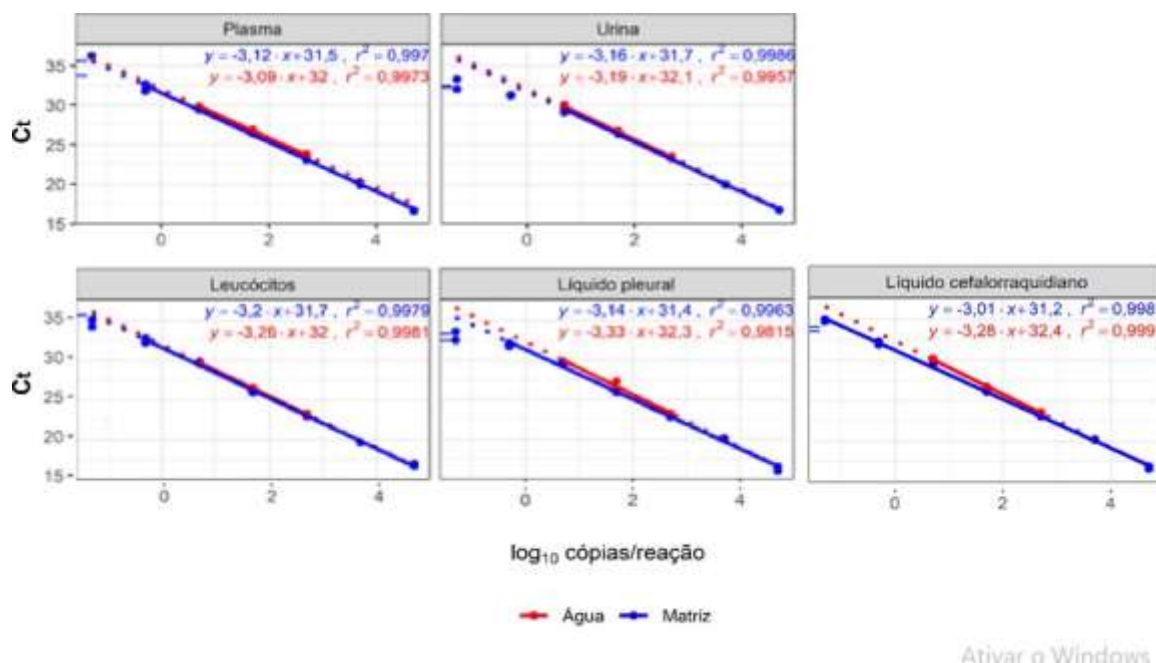
Tabela 4 - Curvas de diluição com Água Milli-Q®, plasma, leucócitos, urina e Líquido Pleural com os respectivos valores de Ct decada ponto que compõe a curva utilizando a qPCR-I e a qPCR-N.

| Curva de Diluição | Ct Água Milli-Q® | | Ct Plasma | | Ct Leucócito | | Ct Urina | | Ct Líquido Pleural | | Ct LCR | |
|-------------------|------------------|--------|-----------|--------|--------------|--------|----------|--------|--------------------|--------|--------|--------|
| | qPCR-N | qPCR-I | qPCR-N | qPCR-I | qPCR-N | qPCR-I | qPCR-N | qPCR-I | qPCR-N | qPCR-I | qPCR-N | qPCR-I |
| 10ng | 14 | 15 | 17 | 15 | 17 | 21 | 17 | 10 | 16 | 14 | 17 | 14 |
| 1ng | 23 | 18 | 20 | 20 | 20 | 25 | 20 | 16 | 20 | 18 | 20 | 17 |
| 100pg | 19 | 21 | 23 | 22 | 23 | 27 | 23 | 18 | 23 | 22 | 23 | 23 |
| 10pg | 22 | 24 | 26 | 26 | 26 | 30 | 26 | 22 | 26 | 24 | 26 | 24 |
| 1pg | 26 | 27 | 29 | 28 | 30 | 31 | 29 | 25 | 30 | 28 | 29 | 29 |
| 100fg | 30 | 30 | 32 | 32 | 33 | 36 | 31 | 29 | 32 | 32 | 32 | 33 |
| 10fg | 32 | 33 | 36 | 33 | 34 | 39 | 32 | 31 | 33 | 35 | 34 | 36 |
| 1fg | 32 | 35 | 35 | 34 | 35 | 38 | 32 | 35 | 33 | 36 | 34 | 38 |
| NTC | 35 | NA | NA | 39 | NA | 39 | NA | 36,5 | NA | NA | NA | NA |

Legenda: Tabela com a descrição dos Cts com qPCR-N em cada ponto das curvas de diluições realizadas em Água Milli-Q®, plasma, PBMC, urina, líquidopleural e LCR ajudando a definir o limite mínimo de detecção do alvo para cada amostra na máquina de qPCR modelo 7500.

Fonte: Tabela feita pela autora, 2018.

Figura 11: Curva de diluição com plasma, leucócitos, urina, líquido pleural e LCR com os respectivos valores de Ct de cada ponto que compõe a curva.



Legenda: A figura 11 trata das curvas de diluição padrões realizadas com DNA de *Mtb* em amostra biológica (plasma, leucócitos, urina, líquido pleural e LCR). O eixo X é o número da cópia inicial por reação e o eixo Y é o ciclo limite (Ct). Sendo alinhada azul a curva realizada com amostra biológica e a vermelha a curva com água MiliQ®, afim de comparar a diluição entre ambas.

Fonte: Tabela feita pela autora, 2019.

8.3 Comparação do Ct do IS6110 do DNA do *M. tuberculosis* da qPCR com os insumos nacionais e com insumos Importados, em amostras biológicas de indivíduos “Sem TB” e com “TB Extrapulmonar”

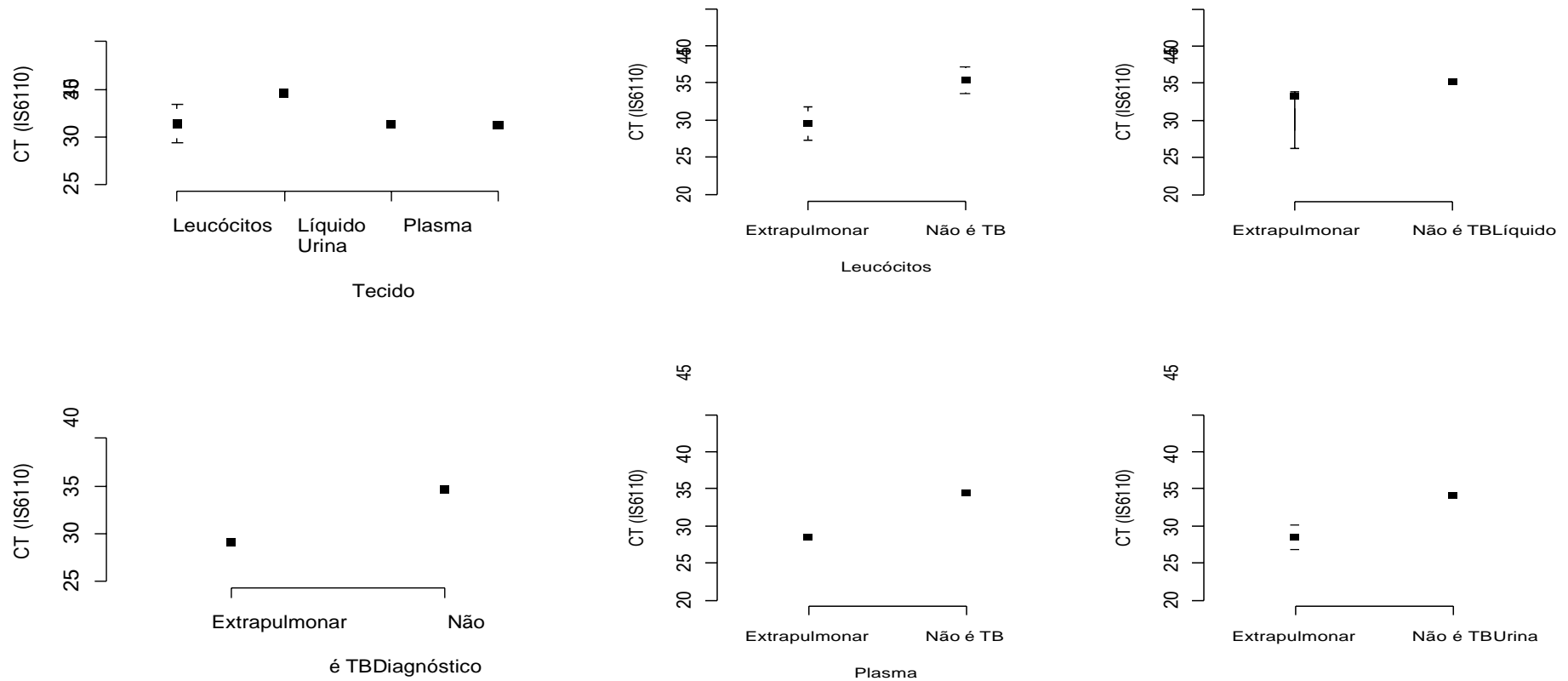
Do total de 43 indivíduos foram coletadas 103 amostras biológicas, 56 foram provenientes do grupo “Sem TB” e 47 amostras provenientes do grupo com “TB extrapulmonar”. Entre os testes para qPCR-N foram considerados como positivos os Ct até 35 em plasma e em leucócitos, até 32 em urina e em água MiliQ®, e até 33,5 para outros líquidos biológicos (considerando a média dos Cts de Líquido pleural e LCR) enegativas as amostras com Ct maior que esses descritos anteriormente. A média do Ct em todas as amostras testadas foi de 33,5. No grupo de “TB extrapulmonar” o teste com qPCR-N demonstrou ser positivo em 37 amostras e negativo em 10 amostras. No grupo “Sem TB” o mesmo teste demonstrou ser positivo em 51 amostras e negativas em 5 amostras (Tabela 6).

Foi considerada positiva para TB nos testes com qPCR-I as amostras que tinham Ct até 33, e negativas as amostras com Ct maior que 33. Observou-se que no grupo de amostras “TB extrapulmonar” foram 21 positivas e 26 negativas, já no grupo de amostras “Sem TB” nenhuma foi positiva e todas as 56 amostras foram negativas (Tabela 6).

Em cada reação da qPCR foi utilizado controle interno (18S), *primers* específicos para o alvo IS6110, e controle positivo com DNA da cepa de referência H37Ra. Os alvos IS6110 e 18S foram detectados em todas as amostras e no controle positivo. Nenhum dos alvos foi detectado na reação sem template (NTC). Os Cts detalhados de cada amostra estão nos Anexos B e C.

A variação do Ct com qPCR-N no grupo “TB Extrapulmonar” nas amostras coletadas de plasma, leucócitos, urinas e outros líquidos biológicos foi de, respectivamente: 24 — 30; 24-35; 23-33; e 31-36. No grupo “Sem TB” a variação de Ct com a mesma técnica em amostras de plasma, leucócitos, urinas e outros líquidos biológicos foi de, respectivamente: 31 — 35; 33-39; 31-35 ; e 30-36 (Figura 12).

Figura 12: Variação dos Cts das amostras com “Tuberculose extrapulmonar” e “sem Tuberculose” e utilizando o qPCR-N com alvos IS6110.



Legenda: Gráfico da média de Cts de cada espécime analisado com qPCR-N e a média de Cts dos grupos “TB extrapulmonar” e “Sem TB” Os Cts das urinas variou entre 23 e 35 os Cts dos Plasma variou entre 24 e 35; os Cts dos Leucócitos variou entre 24 e 39; E os Cts dos Outros líquidos biológicos variou entre 30 e 37

Fonte: Tabela feita pela autora, 2020.

8.4 Desempenho dos testes de qPCR-I e qPCR-N em 103 amostras.

Foi calculada a intensidade da concordância entre as técnicas de qPCR-N e qPCR-I para avaliar a confiabilidade dos testes e o diagnóstico da TBE através da análise de um Padrão de Referência Composto (PRC) que inclui a cultura, o diagnóstico clínico e/ou a resposta ao tratamento.

O teste com qPCR-N correspondeu com o PRC para um total de 47 amostras TB extrapulmonar e 56 amostras “Sem TB”. No grupo com “TB extrapulmonar” foram 37 amostras positivas tanto com PRC, quanto com a qPCR-N, mas 10 amostras foram negativas para o teste e o PRC. Já no grupo “Sem TB” foram 7 amostras positivas e 53 amostras negativas (Tabela 6). Quando analisando o teste com a qPCR-I no grupo “TB extrapulmonar” foram 22 amostras positivas e 25 amostras negativas. Já no grupo “Sem TB” nenhuma amostra foi positiva e 60 amostras foram negativas (Tabela 6).

Entre todas as amostras coletadas para o estudo foram obtidas 59 amostras de plasmas e leucócitos, juntamente. Também tinha 26 amostra de urinas e 20 amostras de outros líquidos (L. Ascítico, LCR, L. Pleural, Escarro e L. Peritoneal).

Nos resultados da avaliação do desempenho da qPCR-N, utilizando o PRC foram obtidas sensibilidade de 78.72% e especificidade de 88.33%. Já no desempenho da qPCR-I foram obtidas sensibilidade de 46,81% e especificidade de 100%. Na qPCR-I o valor preditivo positivo (VPP) foi de 100% (85.13, 100), o valor preditivo negativo (VPN) foi de 66.67% (56.5, 75.82) e a Precisão de Diagnóstico através dessa técnica foi de 72.82% (63.52, 80.47). Quando analisada a qPCR-N o valor preditivo positivo (VPP) foi de 88.1% (75, 94.81), o valor preditivo negativo (VPN) foi de 83.61% (72.39, 90.84), dessa forma, foi identificado a Precisão de Diagnóstico de 85.44% (77.35, 90.97) (Tabelas 6).

Também foi utilizado o teste estatístico de análise de concordância Kappa. O valor do índice kappa de concordância encontrado para o teste qPCR-N e o PRC foi de 0.704 (0.5118 - 0.8961), e entre o teste da qPCR-I e PRC foi de 0.426 (0.2666 - 0.5825), com relação a todas as variáveis dependentes avaliadas o valor de kappa foi sempre acima de 0,6 conferindo um resultado substancial para ambos os testes comparados ao padrão-ouro (Tabela 6). Outra análise realizada foi entre a concordância do teste com qPCR-N e com qPCR-I sendo encontrado Kappa igual a 0.4506 (0.284 - 0.6172) (Tabela 5).

Tabela 5: Tabela comparativa do desempenho da qPCR Nacional e qPCR Importada em 103 amostras de 43 indivíduos analisado através do Kappa.

| qPCR (Todas as amostras) | qPCR-N | | Kappa | Valor de p |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| | Positive N (%) | Negative N (%) | | |
| qPCR-I | | | | |
| Positivo | 18 (17.5) | 1 (1.0) | 0.4506 | < 0.0001 |
| Negativo | 24 (20.3) | 60 (58.2) | (0.284 - 0.6172) | |

Fonte: Tabela feita pela autora, 2020.

Tabela 6: Tabela desempenho da qPCR Nacional e qPCR Importada em 103 amostras de 43 indivíduos, comparado com Padrão de Referência Composto para todas as amostras.

| qPCR (Todas as amostras) | PRC | | Sensibilidade (95% CI) | Especificidade (95% CI) | VPP (95% CI) | VPN (95% CI) | Precisão de Diagnóstico | Kappa (95% CI) |
|-----------------------------|-------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-------------------|
| | TBE (Positivo) | Sem TB (Negativo) | | | | | | |
| | N (%) | N (%) | | | | | | |
| qPCR-I | | | | | | | | |
| Positivo | 19 (21.6) | 0(0) | 40.43% | 100% | 100% | 66.67% | 72.82% | 0.426 |
| Negativo | 28(26.7) | 56 (57.6) | (27.64, 54.66) | (93.58, 100) | (85.13, 100) | (56.5, 75.82) | (63.52, 80.47) | (0.2666 - 0.5825) |
| qPCR-N | | | | | | | | |
| Positivo | 37 (38.1) | 5 (5.1) | 78.72% | 91.07% | 88.1% | 83.61% | 85.44% | 0.704 |
| Negativo | 10(10.3) | 51 (52.5) | (65.1, 88.01) | (80.74, 96.13) | (75, 94.81) | (72.39, 90.84) | (77.35, 90.97) | (0.5118 - 0.8961) |

Fonte: Tabela feita pela autora, 2020.

9 DISCUSSÃO

A tuberculose (TB) está entre as dez principais causas de morte nos países em desenvolvimento de acordo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Os altos índices de mortalidade e morbidade provocados pela TB estimularam a OMS a criar a “Estratégia pelo Fim da Tuberculose” com metas até 2035 (BRASIL, 2011). Dessa forma, tratamentos anti-TB mais eficazes e um diagnóstico rápido e preciso são alguns dos pilares que essa estratégia da OMS busca atuar (WANG *et al.*, 2019).

O diagnóstico da TB se torna ainda mais necessário para casos de TB extrapulmonares, pois os métodos laboratoriais convencionais como baciloscopia, histopatológico e cultura (padrão-ouro para a doença) apresentam limitações como a demora para os resultados, e também uma baixa sensibilidade, sobretudo por se tratar de formas paucibacilares da doença. Dessa forma, tornou-se essencial o desenvolvimento, a otimização e a validação de um método que seja, mais sensível, específico e de baixo custo, em relação aos métodos atuais, para o diagnóstico de TB. (BRASIL, 2011; RAJ *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2019)

Testes moleculares da Reação em Cadeia Polimerase (PCR) serviram de base para outros métodos de amplificação de ácido nucleico, sendo a PCR em tempo real uma técnica promissora na identificação do *M. tuberculosis*. É capaz de quantificar regiões alvos de ácidos nucleicos com precisão, podendo ser utilizada como um método auxiliar dos demais já existentes (PUROHIT; MUSTAFA, 2015; PARASHAR *et al.*, 2006; RAVEENDRAN; WATTAL, 2016).

Nesse estudo foi realizada a otimização de um ensaio baseado em PCR em tempo real utilizando insumos nacionais para identificação do *IS6110* presente no genoma do *Mycobacterium tuberculosis*. O modelo utilizado foi o de Barletta e colaboradores (2014) com algumas modificações nas condições da qPCR, como também nas concentrações e volumes dos reagentes (Tabela 3).

Como parâmetro para determinar a quantidade de DNA genômico, este estudo utilizou uma curva de diluição com água Milli-Q®, plasma, leucócitos, urina e outros líquidos, semelhante ao utilizado em Santos *et al.*, 2018, variando a concentração de 10ng / μ L a 1fg de bacilos / μ L, sendo observada a concentração de 1fg de bacilos / μ L para as curvas de plasma, leucócitos, urina, outros líquidos total e Água Milli-Q®), correspondente ao valor do Ct.

Este estudo utilizou o protocolo da otimização do valor de amplificação limiar (Ct) realizada por Santos (2018), em que foi estabelecida uma média do Ct de 33 (25-33) para teste positivo com a qPCR-I, já o Ct médio para todas as amostras com a qPCR-N foi positivo quando abaixo de 33,5 (23,5-33,5).

Na otimização da qPCR-N foi identificado o limite de detecção na concentração de 1fg/ μ L, com CT de 32, para curva de diluição realizada com água miliQ, urina e líquido pleural, e também com concentração de 1fg/ μ L, mas com CT de 34 e 35, respectivamente, para plasma e leucócitos. Baseado nesses limites de detecção com o teste qPCR-N foram analisadas um total de 103 amostras (47 amostras do grupo "TB extrapulmonar" e 60 amostras do grupo "Sem TB"), sendo de 59 amostras de plasmas, juntamente com leucócitos, 26 amostras de urinas, e 20 amostras de outros líquidos como L. Ascítico, LCR, L. Pleural, L. Peritoneal e L. Traqueal.

Assim, já foi possível observar algumas diferenças de valores entre os Cts obtidos, e a antecipação dos Cts quando realizada a qPCR-N, demonstrando que a qPCR-N amplifica a região alvo mais rapidamente do que a qPCR-I, e, conseqüentemente, chega mais rápido na fase exponencial da reação (caracterizada por sua especificidade e precisão). Também foi observado que quando utilizada a qPCR-N o Ct do limite de detecção aumento quando comparado a qPCR-I, podendo indicar que na qPCR-N é necessário um Ct maior para detectar o DNA através do alvo IS6110. Dessa forma, segundo Biosystems (2001) como há uma correlação inversamente proporcional entre o Ct e a concentração do número de cópias determinada inicialmente, é possível inferir que a qPCR-N requer uma menor concentração de DNA para detectar o alvo em questão quando comparado à qPCR-I.

O estudo de Albuquerque et al. (2014), com um total de 140 amostras de escarro de pacientes com HIV positivos, identificou 39 dos 42 pacientes positivos através da qPCR (VPP=97,6%; VPN=93,9%). Entre as amostras verdadeiramente positivas utilizando a qPCR (com *primers* e sonda diferentes da qPCR-I) comparada a cultura (padrão-ouro), o Ct foi inferior ou igual a 37. Quando comparados os Ct desse estudo com os encontrados com as qPCR-N (variação do Ct=32 a 35) e qPCR-I (Ct médio=33), é possível perceber que o Ct do limite de detecção com a qPCR-N e qPCR-I é menor. Por tanto, era necessário menor concentração de DNA na qPCR de Albuquerque et al. (2014) do que na qPCR-N e qPCR-I. Esse resultado pode ter relação com as amostras usadas por Albuquerque et al. (2014) serem de escarros

provenientes de pacientes com TB pulmonar, que mesmo se tratando pacientes HIV positivos a quantidade de bacilos nas mesmas pode ser maior do que nas amostras analisadas no presente estudo, que utilizou 87,5% de amostras de sangue e urina, materiais que contêm baixa concentração de DNA do bacilo ainda mais em pacientes com TB extrapulmonar.

Almeida et al. (2018) realizou um estudo com qPCR em 334 indivíduos com suspeita de TB meningoencefálica (TBM) sendo 21 pacientes categorizados como definitivos ou prováveis, e com Ct menor ou igual a 39,5. Os ensaios com qPCR-N e qPCR-I obtiveram Ct menor do que o definido por Almeida et al. (2018). Mas a sensibilidade (de 29%) foi inferior quando comparada com a qPCR-N (78,7%) e a qPCR-I (40,4%), e a especificidade (de 95%) foi semelhante aos ensaios com qPCR-N e qPCR-I, com 91% e 100%, respectivamente. Sendo assim, é possível que baixa sensibilidade encontrada por Almeida et al. (2018), mesmo com Ct mais elevado e maior número de amostras, se deva ao uso apenas de LCR, que no presente estudo que além de incluir amostras de LCR, também utilizou plasmas, leucócitos, urinas, líquido ascítico, pleural, peritoneal entre outros líquidos biológicos.

Técnicas de biologia molecular como PCR convencional, Nested-PCR e PCR em tempo real melhor sensibilidade quando comparadas ao métodos convencionais de diagnóstico de detecção do *MTB* utilizando o mesmo alvo molecular como descrito em Portillo-Gómez et al.(2000), demonstrando um limite de detecção de 1bacilo/mL ou 5fg/ μ L de DNA genômico do *MTB*, e de 5fg/ μ L, nos demais artigos (Lira et al., 2013; Lima et al, 2009).

O estudo de Santos et al., 2018 demonstrarou, por PCR em tempo real, que o limite de detecção através da purificação do DNA da cepa de referência H37Rv em amostras de sangue e urina foi de 15fg/ μ L, menos sensível que o obtido nesse trabalho. Issa et al. 2012, também utilizando a técnica PCR em tempo real, encontraram um limite de detecção de 10pg/ μ L de DNA do *MTB*, o que se equivale à 2.000 bacilos/ml, limite muito acima do encontrado neste estudo, possivelmente por ter sido utilizado o alvo molecular *gyrB*, diferentemente do alvo selecionado em neste estudo. Broccolo et al., 2003, utilizando o mesmo sistema de PCR em tempo real e alvo molecular aos estudos de Lira et al. (2013) e Santos et. al (2018), obtiveram um limite de detecção de 1fg/ μ L, igual ao obtido nesse estudo, provavelmente por ter sido

avaliado com DNA plasmidial diluído em água, livre de inibidores presentes nas amostras clínicas.

A cultura é considerada pelo Ministério da Saúde o padrão-ouro para reconhecer o *M. tuberculosis*, porém a mesma necessita de um limite mínimo de detecção (10 bacilos por mililitro de amostra) muitas vezes insuficiente para detectar o bacilo em amostras paucibacilares, e a baciloscopia obtém um resultado positivo, em amostra que contém, no mínimo, 5.000 bacilos por mililitro, tratando-se de um exame pouco sensível, apesar de bastante específico. (ALBUQUERQUE; et al 2014; PUROHIT, 2015; NOUSSAIR et al., 2009). Por estas razões a autora considerou como padrão ouro um conjunto de critérios (vide metodologia) que chamou de Padrão de Referência Composto (PRC). Neste contexto, através da qPCR-N foi detectado 37 amostras verdadeiramente positivas, maior percentual de positividade quando comparado a qPCR-I com 19 amostras positivas, tendo sido considerado como padrão-ouro o PRC.

Entre as amostras testadas com qPCR-I foi identificada 28 (26.7%) amostras falso-positivas e nenhuma amostra falso-negativa. No ensaio com qPCR-N foram identificados apenas 10 (10.3%) amostras falso-positivas e 5 (5.1 %) amostras falso-negativas. Estes valores falso-positivos podem ser atribuídos a uma contaminação durante a PCR, já os resultados falso-negativos podem estar relacionado a presença de inibidores da PCR ou à distribuição não uniforme dos bacilos nessas amostras (BENTO et al., 2011; CAUSSE et al., 2011). Dessa forma, o melhor desempenho da qPCR-N em relação a qPCR-I também pode estar relacionado aos diferentes *primers* e sondas utilizados entre as técnicas, que permitiu a qPCR-N ser mais sensível.

Segundo Lopes et al. (2006) a maioria das localizações da TB extrapulmonar acontece em órgãos sem condições ótimas de crescimento bacilar, sendo quase sempre de instalação insidiosa e evolução lenta, isso acarreta uma produção paucibacilar nesses órgãos e conseqüentemente produz amostras de igual carga bacilar ou inferior dificultando a detecção do bacilo através de métodos de diagnóstico convencionais. Por tanto, o diagnóstico para TB extrapulmonar é determinado principalmente pelo conjunto dos critérios clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e resposta terapêutica específica, ou PRC (BRASIL, 2011).

Santos (2018) utilizou como padrão-ouro um conjunto de critérios (PRC) que inclui diagnóstico laboratorial (cultura, baciloscopia e/ou Gene Xpert para *M.tb*),

diagnóstico clínico e/ou resposta terapêutica para determinar a positividade para tuberculose e obteve um aumento na sensibilidade, o que levou à esta pesquisa utilizar o mesmo critério.

Rebollo e colaboradores (2006) defende a utilização de amostras menos invasivas para detectar o *M. tuberculosis*, como amostras de urina e sangue (os leucócitos englobam as bactérias), pois dispensam a internação do paciente para a realização do procedimento. Também é importante ressaltar que a sensibilidade em amostras de sangue para detecção da sequência de inserção IS6110 tem se mostrado melhor do que a cultura e a especificidade tem se mantido semelhante (FOLGUEIRA et al., 1994; KOX et al. 1994; LEE et al., 1994; MELO *et al.*, 2010).

As técnicas baseadas em qPCR podem ter suas sensibilidades comprometidas quando o número absoluto de moléculas de DNA alvo é afetado por agentes interferentes. Esta técnica também pode identificar DNA alvo de bacilos não viáveis, aumentando sua sensibilidade, permitindo que esta possa auxiliar no diagnóstico da TBEP, mas impedindo que a mesma seja empregada para monitoramento de resposta ao tratamento ou progresso do paciente (CAUSSE et al., 2011; LIMA et al., 2015; RESTREPOA et al., 2006).

Com o intuito de minimizar a interferência de inibidores das amostras não-estéreis como urina, suco gástrico, lavados brônquicos, secreções purulentas, entre outros passaram por processo de descontaminação (BACH, 2003; BOLLELA, 1999). Dentre os componentes contidos na urina capaz de interferir na PCR, estão os sais, enzimas, ureia, pH baixos e outras bactérias que podem comprometer o processo de purificação do DNA e inibir a reação de qPCR. Além disso, as micobactérias foram distribuídas de forma não-homogênea na urina, pois o rim não foi o principal sítio da infecção (ZAMBARDI et al., 1995; CARNEVALE; ANTONANGELO, 2015).

As amostras de sangue tiveram o plasma e leucócitos separados para reduzir a interferência por competição entre os íons de Fe^{++} (contido no grupo heme da hemoglobina) com os íons Mg^{++} (fundamentais na ação da enzima DNA polimerase), como também por esses inibidores serem resistentes à fervura, à proteinase e não serem dissolvidos em solventes orgânicos. Desta forma, estes inibidores podem permanecer na amostra prejudicando a reação da qPCR (AL-SOUD; RÂDSTRÖM, 2001; AN; CARNEVALE; ANTONANGELO, 2015).

A extração de DNA, foi realizada pelo kit comercial Qiagen, que é um processo de purificação do material nuclear utilizando colunas a fim de que reduza a ação de materiais interferentes como etanol, utilizado durante o processo tradicional (*in house*) de extração do ácido nucleico, e como o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), ainda presente na amostra após a separação do plasma e leucócitos (BACH, 2003; CARNEVALE; ANTONANGELO, 2015; VALENTINE-THON, 2002).

Diferentemente de Cruz et al. (2011) e Lima et al. (2006) que obtiveram uma sensibilidade maior (78%) analisando apenas amostras de urina de paciente com TB renal, através da Nested-PCR A menor precisão e reprodutibilidade dos resultados da nested-PCR podem ser devido ao processamento pós-PCR em que a detecção utiliza eletroforese permitindo maior taxa de contaminação durante o manuseio (SALAZAR, 2012). No entanto, nosso estudo utilizou amostras de urina de pacientes com diferentes formas de TB extrapulmonar ou seja com menor probabilidade de identificar o bacilo na urina.

Green et al. (2009) apontaram em seu estudo que há evidências da presença de fragmentos de DNA do *Mycobacterium tuberculosis* circulante no sangue e na urina de pacientes com tuberculose. Isso ocorre porque, quando o sistema imune reage aos bacilos ou às células mortas que englobaram os bacilos estes são destruídos, e os fragmentos derivados desses ácidos nucléicos livres dos bacilos podem permanecer no sangue circulante. Quando esse sangue é filtrado pelos rins alguns desses fragmentos de DNA ultrapassam para serem excretados na urina, este é conhecido como DNA transrenal, o que não significa que o paciente tenha a forma de TB renal. Desta forma, em nosso estudo foi utilizado amostras de urina e sangue de pacientes acometidos por TB extrapulmonar em diversos sítios. Quando foi analisado 103 amostras de plasmas, leucócitos, urinas e outros líquidos, utilizando como padrão-ouro a PRC, a sensibilidade e especificidade da qPCR-N foi de 78,78% e de 88,3%, respectivamente, e a sensibilidade e especificidade da qPCR-I foi de, respectivamente, 40,43% e 100%.

O desempenho da qPCR I (*in house*) varia muito na literatura, sobretudo em amostras extrapulmonares ou paucibacilares, como nos ensaio em qPCR nos quais as sensibilidades em Almeida et al. (2018) foi de 29%, e em Albuquerque et al. (2014) foi de 87,2%, ou ainda em Kim et al (2021) em ensaio com Xpert MTB / RIF a sensibilidade foi de 59,4%, apesar das especificidades em ambos os estudos serem

semelhantemente elevadas. A variação no seu desempenho pode ser devido a inúmeros fatores como: forma clínica da TB; tipo de espécime biológica; número *amostral*; tipo de padrão ouro considerado; condições de otimização das várias fases de otimização da qPCR, entre outros.

Causse et al. (2011) observaram com 340 amostras de pacientes com suspeita de TBE, utilizando a qPCR em líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido pleural, fluidos articulares, fluido ascítico, biópsia (de nódulos linfáticos, pulmonares, estômago, e amostras de osso), aspirados gástricos, fluidos do pericárdio, e exsudado purulento, com uma sensibilidade de 78% para o kit Cobas TaqMan MTB, e 95% para o ensaio com Xpert MTB / RIF. No nosso estudo, com número *amostral de 103*, obteve-se uma sensibilidade baixa da qPCR-I (40,4%) provavelmente devido a amostra analisada ter sido pequena. No entanto a qPCR-N demonstrou resultado semelhante de sensibilidade (78,7%), demonstrando desde já o grande potencial no desempenho da técnica otimizada com reagentes nacionais. Provavelmente devido a mudanças nas condições da qPCR, concentração de reagentes, *primers*, entre outros, não informados devido a esta técnica está sob processo de patente.

Em relação a aplicação do coeficiente de Concordância de *Kappa*, quando foi considerado para o fechamento de diagnóstico de TB o conjunto de critérios elaborado pela autora (PRC) e o teste de qPCR-N, o valor encontrado foi de 0.704 (0.5118 - 0.8961), enquanto que com a qPCR-I foi de 0.426 (0.2666 - 0.5825). Observou-se então que a concordância foi substancial para a qPCR-N quando comparada ao padrão-ouro (PRC). Quando considerou-se a concordância entre os dois testes moleculares de qPCR, encontrou-se um valor de *Kappa* de 0.4506 (0.284 - 0.6172), demonstrando uma concordância razoável entre eles. Assim, provavelmente o teste de qPCR-N apresentou-se mais promissor para a detecção da TB em amostras biológicas paucibacilares.

Porém, para que os resultados encontrados de sensibilidade, especificidade e índice de concordância kappa possam ser validados, é importante que o número amostral seja atingido. Dessa forma, os atuais resultados podem melhorar já que o número amostral atual é baixo, mas foi suficiente para demonstrar o quanto os métodos moleculares podem ser promissores, sobretudo em relação ao teste molecular com reagentes nacionais,

Observou-se uma tendência de melhora da sensibilidade e especificidade em relação a qPCR-N, mas ainda sem significância estatística. De uma maneira geral, os resultados demonstraram que o desempenho da qPCR-I e qPCR-N foram capazes de detectar a presença do *M. tuberculosis* no grupo de pacientes com TBE e em diferentes amostras biológicas paucibacilares estudadas.

Broccolo et al. (2003), tendo considerado como padrão ouro o mesmo conjunto de critérios (PRC) para o diagnóstico de TB que o nosso estudo bem como o teste de qPCR-I em amostras biológicas diferentes como expectoração, urina, líquido cefalorraquidiano, fluido de lavagem nasogástrica, e lavado brônquico, encontraram uma sensibilidade maior de 98% e especificidade de 97% em 121 amostras de espécimes pulmonares e extrapulmonares. É provável que este desempenho tenha sido melhor que encontrado em nosso estudo, tanto com a qPCR-N, ou qPCR-I devido a utilização de um número amostral maior, e de amostras pulmonares (além das extrapulmonares), ou seja que tem um maior número de bacilos.

Em estudo utilizando o teste do Xpert MTB/RIF, envolvendo 4461 amostras extrapulmonares, foram obtidas sensibilidade variadas a depender do tipo de amostra analisada: em aspirados ou nódulos linfáticos foi de 83,1%, em amostras de LCR (líquido cefalorraquidiano) foi de 80,5% e em amostras de líquido pleural a sensibilidade caiu para 46,4%, mesmo assim a especificidade dessa técnica se manteve acima de 98% para todas as amostras (DENKINGER et al., 2014). Em outro estudo com 429 amostras em que 176 eram de pacientes extrapulmonares também utilizando o teste do GeneXpert MTB/RIF em espécimes extrapulmonares também foi obtido uma sensibilidade baixa (52,1%), mas a especificidade foi alta (100%), semelhante ao desempenho da qPCR-I encontrada neste trabalho (ZEKA; TASBAKAN; CAVUSOGLU, 2011). Então, a sensibilidade qPCR-N, demonstrou ser melhor em relação aos estudos citados.

Os testes do IBMP (qPCR-N) serão fornecidos ao MS com valores abaixo do mercado com custo de aproximadamente R\$ 95,00 reais (valor ainda em ajuste) por amostra (Tabela 2). No momento é impossível estimar um valor neste estágio, até porque o kit final será composto também pelas reações de detecção de resistência a INH e a RIF.

A falta de um diagnóstico rápido e confiável para a tuberculose constitui um sério problema, que muitas vezes reflete no insucesso dos programas de controle

desta endemia. Apesar da detecção, na fase inicial da doença, ser de vital importância para uma terapêutica precoce, o diagnóstico da TBE permanece complexo. As razões se devem, principalmente, ao difícil acesso para coleta da amostra na maioria das lesões e por tratar-se habitualmente de pacientes com baixa carga bacilífera circulante.

Pode-se observar neste estudo, que as técnicas moleculares de qPCR, sobretudo a qPCR-N, podem auxiliar no diagnóstico da TB extrapulmonar, dado que essa forma de TB proporciona amostras paucibacilares produzindo maior percentual de exames bacteriológicos negativos, porém o conjunto dessas técnicas e critérios diagnósticos (PRC) podem permitir um melhor desempenho no resultado. (SANTOS et al. 2018).

Portanto, a PCR em tempo real com reagentes nacionais, além de prometer um custo acessível para o SUS, auxiliaria no tratamento específico e precoce da TB, bem como na redução dos casos de resistência à drogas antituberculosas e na diminuição da mortalidade e morbidade causados por esse bacilo em regiões endêmicas como Pernambuco.

10 CONCLUSÃO

1. Para validação multicêntrica da qPCR-N será necessário aumentar a quantidade de amostras biológicas e de pacientes avaliados, o que permitirá calcular o desempenho do teste com maior precisão.
2. A qPCR com reagentes nacionais mostrou bom desempenho e um limite de detecção e sensibilidade superiores aos métodos convencionais (baciloscopia e cultura) e semelhante à qPCR com insumos importados, podendo ser utilizada como uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico da TB, inclusive nos casos paucibacilares.
3. Provavelmente a qPCR nacional, poderá ser utilizada em laboratórios da rede pública de saúde como uma ferramenta diagnóstica de menor custo.
4. Faz-se necessário mais pesquisas relacionadas a novos testes moleculares, produzidos no Brasil e seu desempenho para o diagnóstico de todas as formas de TB

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALAM, M. S. *et al.* Surgery for spinal tuberculosis: a multi-center experience of 582 cases. **Journal of Spine Surgery (Hong Kong)**, v. 1, n. 1, p. 65–71, 2015.

AL-SOUD, W. A.; RÅDSTRÖM, P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 2, p. 485–493, 2001.

ALBUQUERQUE, Yvana Maria Maia de; LIMA, Ana Luiza Magalhães de Andrade; LINS, Ana Kelly; MAGALHÃES, Marcelo; MAGALHÃES, Vera. Quantitative real-time PCR (q-PCR) for sputum smear diagnosis of pulmonary tuberculosis among people with HIV/AIDS. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, [S.L.], v. 56, n. 2, p. 139-142, abr. 2014. *FapUNIFESP (SciELO)*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652014000200009>. Acesso em: 19 mar. 2021.

ALMEIDA, Sérgio M. de; BORGES, Conrado M.; SANTANA, Lucas B.; GOLIN, Gilberto; CORREA, Lísia; KUSSEN, Gislene B.; NOGUEIRA, Keite. Validation of Mycobacterium tuberculosis real-time polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculous meningitis using cerebrospinal fluid samples: a pilot study. **Clinical Chemistry And Laboratory Medicine (Cclm)**, [S.L.], v. 57, n. 4, p. 556-564, 29 set. 2018. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2018-0524>.

ALMEIDA, Valéria Zanetti. **Cidade e Identidade: São José dos Campos, do peito e dos ares**. 2012. Tese (Doutorado) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 2012.

AN, S. F.; FLEMING, K. A. Removal of inhibitors of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin-wax embedded tissues. **Journal of clinical pathology**, Londres, v. 44, p. 924, 1991.

ARAÚJO, Romário Martins; SCHINDLER, Haiana Charifker. **Avaliação de um sistema baseado em LAMP (amplificação isotérmica em alça) na detecção do alvo molecular IS6110 para diagnóstico da tuberculose extrapulmonar**. 2019. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia, Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz de Pernambuco, Recife, 2019.

BABAFEMI, EO, CHERIAN, BP, BANTING, L., MILLS, GA, & NGIANGA, K., 2 Eficácia do ensaio de reação em cadeia da polimerase em tempo real para a detecção de Mycobacterium tuberculosis em amostras patológicas: uma revisão sistemática e meta-análise. **Revisões sistemáticas**, 6 (1), 215. 2017. <https://doi.org/10.1186/s13643-017-0608-2>

BACH, A. H. **Aplicação de técnica molecular no desenvolvimento de teste para diagnóstico de tuberculose paucibacilar e na caracterização genotípica do Mycobacterium tuberculosis**. 2003. Dissertação (Mestrado em Genética)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

BARLETTA, F. et al. Standardization of a TaqMan-based real-time PCR for the detection of Mycobacterium tuberculosis-complex in human sputum. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 91, n. 4, p. 709–14, out. 2014

BARRETO, A. M. W. *et al.* **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2005.

BENTO, J. *et al.* Métodos de diagnóstico em Tuberculose. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, n. 1, p. 145–154, 2011.

BIOSYSTEMS, Applied. Guia do Usuário do Sistema de PCR em tempo real ABI PRISM 7000. São Paulo: **Life Technologies do Brasil Com.** Ind. Prod. Biotec Ltda., 2001. 509 p. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/latin-america/promotions/pdf/DirectionsOfUse/10358940007%20Sistema%20PCR%20em%20Tempo%20Real.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2021.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Secretária em Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. **Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença**, Brasília, v.50, n.9, 2019.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Secretária em Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. **Implantação do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil: primeiros passos rumo ao alcance das metas**, Brasília, v.49, n.11, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Panorama da tuberculose no Brasil: indicadores epidemiológicos e operacionais**/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde (2019). **Sistema de Informações de Agravos de Notificação**. Banco de dados agregados do DATASUS. Disponível em : <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/tubercpe.def>> Acesso em: 20 de nov.2020.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde (Org.). **Guia de Vigilância em Saúde**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 706 p. Disponível em: <<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/outubro/06/Volume-Unico-2017.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Portaria nº 48, de 10 de setembro de 2013. Torna pública a decisão de incorporar o Teste Xpert MTB/RIF para diagnóstico de casos novos de tuberculose e detecção de resistência à rifampicina no Sistema Único de Saúde — SUS**. 2013. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sctie/2013/prt0048_10_09_2013.html >.

Acesso em: 20 fev. 2019.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretária de vigilância em saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de bolso**. 8ª ed. Brasília, 2010. Disponível em: <file:///G:/Downloads/Guia_de_bolso_doencas_infecciosas_e_parasitarias.pdf>. Acesso em: Outubro de 2016. p. 1–186, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. — Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Técnicas de aplicação e leitura da prova tuberculínica**. Brasília, 2014

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias**. 1. ed. Brasília, DF, 2008. Disponível em: <http://www.lacen.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Manuais/manual_laboratorio_Tuberculose_3_9_10.pdf >. Acesso em: 23 de fev. 2019.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias**. 1. ed. Brasília, DF, 2008. Disponível em: <http://www.lacen.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Manuais/manual_laboratorio_Tuberculose_3_9_10.pdf >. Acesso em: 30 de nov. 2016.

BRATS: Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Brasília, DF: **ANVISA**, ano 6, n. 16, set. 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33884/412285/Boletim+Brasileiro+de+Avalia%C3%A7%C3%A3o+de+Tecnologias+em+Sa%C3%BAde+%28BRATS%29+n%C2%BA+16/42e74aa8-45fc-4ee8-a81b-44c6c062865f?version=1.1> >. Acesso em: 12 de abr. 2019.

BROCCOLO, F. *et al.* Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of Mycobacterium tuberculosis load by two real-time calibrated PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 10, p. 4565-4572, 2003.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **American Association for Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009

CAMPOS, H. S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão RJ**, v. 15, n. 1, p. 29–35, 2006.

CARNEVALE, Gabriela Gaspar; ANTONANGELO, Leila. **Análise de interferentes na extração, amplificação e detecção de *M. tuberculosis* por reação de PCR em amostras de líquido pleural, escarro e lavado broncoalveolar**. 2015. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Pneumologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5150/tde->

12012016-090128/publico/GabrielaGasparCarnevale.pdf. Acesso em: 19 mar. 2021.

CASTRO-GARZA, J. et al. Mycobacterium tuberculosis promotes genomic instability in macrophages. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 3, p. 161–166, mar. 2018.

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

COELHO, A. G. V. et al. Avaliação do crescimento em cordas na identificação presuntiva do complexo Mycobacterium tuberculosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 6, p. 707–711, dez. 2007.

COELHO, F. S.; MARQUES, E. DE A. Etiologia. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 5, n. 2, p. 24–26, 2006.

CRUZ, H. L. A. et al. Evaluation of a Nested-PCR for Mycobacterium tuberculosis detection in blood and urine samples. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, v. 42, p. 321-329, 2011.

DANIEL, Thomas M.. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, [s.l.], v. 100, n. 11, p.1862-1870, nov. 2006. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006>. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095461110600401X>>.
Acesso em: 23 jan. 2019.

DANTAS, João Carlos Pinheiro; FROTA, Cristiane Cunha. **Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre a cepa padrão H37Rv**. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Patologia Tropical, Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014. Disponível em:
<http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/8848/1/2014_dis_jcpdantas.pdf>.
Acesso em: 27 jan. 2019.

DENKINGER, C. M. et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. **European Respiratory Journal**, v. 44, n. 2, p. 435–446, 2014.

FERRI, Anise Osório et al. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 15, n. 24, p.105-212, dez. 2014. Disponível em:
<http://www.liberato.com.br/sites/default/files/arquivos/Revista_SIER/v.%2015%20C%20n.%2024%20%282014%29%2F4%20-%20Tuberculose.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2019.

FIGUEIREDO, E. E. DE S. et al. Detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* no leite pela Reação em Cadeia da Polimerase seguida de análise de Restrição do Fragmento Amplificado (PRA). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1023–1033, 2008.

FOLGUEIRA L., et al. Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculous meningitis in AIDS patients. **Neurology**, vol. 44, n. 7, p.1336-1338, 1994.

FREIRE, Priscilla S. et al. Tuberculose miliar: infecção oportunista grave em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil. *Revista Brasileira de Reumatologia*, [s.l.], v. 56, n. 3, p.274-279, maio 2016. Springer Nature. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2014.04.007>> Acesso em: 15 fev. 2019.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (Rio de Janeiro). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (Org.). **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 6. ed. Rio de Janeiro: Quattri Desenhos, 2008. 348 p. Disponível em: <<http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/81/control-da-tuberculose-uma-proposta-de-integracao-ensino-servico-%5B81-080909-SES-MT%5D.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2019.

GRAÑA, D. *et al.* Espondilodiscitis tuberculosa: uso de los exámenes complementarios con una nueva perspectiva: A propósito de dos casos clínicos y revisión de la literatura. **Archivos de Medicina Interna**, v. 37, n. 1, p. 18–23, 2015.

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

GUARINES, K. M. **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.

KIBIKI, Gibson S.; MULDER, Bert; VEN, Andre J. A. M. van Der; SAM, Noel; BOEREE, Martin J.; ZANDEN, Adri van Der; DOLMANS, Wil M. V.. Laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis in TB and HIV endemic settings and the contribution of real time PCR for M. tuberculosis in bronchoalveolar lavage fluid. **Tropical Medicine & International Health**, [S.L.], v. 12, n. 10, p. 1210-1217, 18 out. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01907.x>.

KIM SK, CHANG J, CHOI SH, SUNG H, KIM MN. Performance of Xpert MTB/RIF for the Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis. **Clin Lab**. 2021 Feb 1;67(2).

KOX, L. F. F. et al. A more reliable PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. **J. Clin. Microbiol**, Washington, DC, v. 32, n. 3, p. 672-678, 1994. LEE BW, et al. DNA amplification by polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculous meningitis. Comparisson of protocols involving three mycobacterial DNA sequences, IS6110, 65kDa antigen, and MPB64. **J Neurol Sci**, v. 123, p. 173-179,1994.

LEE, J. Y. Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. **Tuberculosis and respiratory diseases**, v. 78, n. 2, p. 47–55, abr. 2015.

LENHARO, Mariana. **Estudo relaciona incidência de tuberculose com superlotação em domicílios no Brasil**. 2017. Disponível em: <<http://www.cljornal.com.br/saude/estudo-relaciona-incidencia-de-tuberculose-com-superlotacao-em-domicilios-no-brasil/>>. Acesso em: 08 ago. 2019.

LERNER, T. R. *et al.* Lymphatic endothelial cells are a replicative niche for *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 3, p.1093–1108, 2016.

LIMA, A. J. A. *et al.* Diagnóstico laboratorial das micobactérias isoladas na urina: comparação entre métodos convencionais e a reação em cadeia da polimerase (PCR). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 141-145, 2006.

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

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**, v. 48, n. 6, p. 731–738, 2015.

LIMA, T. M. DE *et al.* Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 2, p. 65–76, jun. 2017

LOPES, Agnaldo José *et al.* Tuberculose extrapulmonar:: aspectos clínicos e de imagem. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, v. 04, n. 15, p.253-261, dez. 2006. Disponível em:<https://www.researchgate.net/profile/Agnaldo_Lopes/publication/238080368_Tuberculose_extrapulmonar_aspectos_clinicos_e_de_imagem_Extrapulmonary_tuberculosis_clinics_and_image_aspects/links/0c96052b9d47c0603f000000.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2019.

LIRA, Laís Ariane de Siqueira *et al.* **AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pósgraduação Stricto Sensu em Saúde Pública, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Recife, 2012. Disponível em: <file:///C:/Users/Dell/Downloads/2012lira-lais.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2021.

MACIEL, M. DE S. *et al.* A história da tuberculose no Brasil : os muitos tons (de cinza) da miséria *. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n.3, p. 226–30, 2012.

MACIEL, Marina de Souza et al. A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria*. **Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, Belo Horizonte, v. 3, n. 10, p.226-230, 23 mar. 2012. Disponível em: <<http://files.bvs.br/upload/S/1679-1010/2012/v10n3/a2886.pdf>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

MCEVOY, Christopher RE et al. The role of *IS6110* in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 87, n. 5, p. 393-404, 2007.

MELLO, M. C. P. DE et al. Mal de Pott : uma revisão bibliográfica dos últimos 5 anos.v. 25, n. 2, p. 173–184, 2014.

MELO, Murilo Rezende et al. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA E MEDICINA LABORATORIAL, 44., 2010, São Paulo. **Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial**. S.N: Protozoologia-Imtsp/ Laboratório de Biologia Molecular-Ipen), 2010. p. 375-381. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jbplm/v46n5/06.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2021.

MENZIES, D.; PAI, M.; COMSTOCK, G. Meta-analysis: new testes for the diagnostic of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 146, p. 340-354, 2007

MILLÁN-LOU, Maria Isabel et al. Global study of IS6110 in a successful *Mycobacterium tuberculosis* strain: clues for deciphering its behavior and for its rapid detection. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3631-3637, 2013.

NOGUEIRA, Antônio Francisco et al. Tuberculose: uma abordagem geral dos principais aspectos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 93, p.3-9, 12 fev. 2012. Disponível em: <<http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-2012-93-1-1.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

NOGUEIRA, Lucas de Lima; BÁFICA, André. **Investigação do papel da proteína codificada pelo gene *rv1419* de *M. tuberculosis* durante a infecção: potencial diagnóstico e propriedades imunoregulatórias**. 2012. 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012. Disponível em: <<file:///D:/Downloads/310349.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2019.

NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P.; SILVA, F. F. PCR em tempo real, n. 33, p. 10-13. Recife: **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 2004.

NYENDAK, M. R.; LEWINSOHN, D. A.; LEWINSOHN, D. M. New diagnostic methods for tuberculosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 22, n. 2, p. 174–82, abr. 2009

OLIVEIRA, Tânia Maria dos Santos; MIRANDA, Luís Manuel Souto de. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010. Disponível em: <<https://ria.ua.pt/bitstream/10773/7230/1/disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf>>. Acesso

em: 20 fev. 2019.

OMS diz que epidemia de tuberculose é mais grave do que se esperava. [Rio de Janeiro], 13 out. 2016. Disponível em:

<<http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2016/10/oms-diz-que-epidemia-de-tuberculose-e-mais-grave-do-que-se-esperava.html>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global tuberculosis report 2020**. Geneva: 2020, p.232. Disponível em: <file:///C:/Users/Dell/Downloads/9789240013131-eng.pdf> Acesso em: 08 nov. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global tuberculosis report**. Genebra, 2018, p. 277. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 24 jan. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (2015) Global tuberculosis report 2015. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf> Acesso em: 9 de nov. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for Intensified Tuberculosis Casfinding and Isoniazid Preventive Therapy for People living with HIV in resource-constrained Settings**, Genebra, 2013, p. 52. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44472/9789241500708_eng.pdf;jsessionid=D74FBCD2546C27D69944E1E3F54B3C23?sequence=1>. Acesso em: 20 fev 2019.

PASSALENT, L. et al. Detecting latent tuberculosis infection in hemodialysis patients: a head-to-head comparison of the T-SPOT TB test, tuberculin skin test, and an expert physician panel. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**. Washington, v. 2. n. 1, p. 68-73, 2006.

PARASHAR, D. et al. Applications of real time PCR technology to mycobacterial research, **Indian Journal of Medical Research**, Mumbai, v. 124, n. 1, p. 385-398, 2006.

PEDRO, Alexandre San et al. Tuberculosis as a marker of inequities in the context of socio-spatial transformation. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 51, p.01-10, fev. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1518-8787.2017051006533>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5308553/pdf/0034-8910-rsp-S1518-87872017051006533.pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2019.

PIATEK, A. S. et al. GeneXpert for TB diagnosis: planned and purposeful implementation. **Glob. Health. Sci. Pract.**, Washington, v. 1, n. 1, p. 18-23, mar. 2013.

PINHEIRO, Stefan Arthur Gerzoschkowitz. **Tuberculose, representação e**

preconceito: breve estudo da história da tuberculose em São José dos Campos/SP (1900-1940). Monografia (Programa de Graduação em História-Faculdade de Educação e Artes), 2016.

PINTO, Márcia et al. Análise de custos de um teste de amplificação de ácido nucleico para o diagnóstico da tuberculose pulmonar sob a perspectiva do Sistema Único de Saúde. **J Bras Pneumol**, v. 41, n. 6, p. 1-3, 2015.

PORTO, A. Representações sociais da tuberculose: estigma e preconceito. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.41, n. 1, p.43-49. 2007.

PUROHIT, M.; MUSTAFA, T. Laboratory Diagnosis of Extra-pulmonary Tuberculosis (EPTB) in Resource- constrained Setting : State of the Art , Challenges and the Need. **Journal of Clinical and Diagnostic**, v. 9, n. 4, p. 1–6, 2015.

RAJ, Ankush et al. Comparative Evaluation of Several Gene Targets for Designing a Multiplex-PCR for an Early Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis. **Yonsei Medical Journal**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.88-96, jan. 2016. Yonsei University College of Medicine (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.3349/ymj.2016.57.1.88>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4696977/>>. Acesso em: 03 fev.2019.

RAMÍREZ-LAPAUSA, M.; MENÉNDEZ-SALDAÑA, A.; NOGUERADO-ASENSIO, A. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. **Rev Esp Sanid Penit**, v. 17, p. 3-11, 2015.

RAVEENDRAN, Reena; WATTAL, Chand. Utility of multiplex real-time PCR in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 235-241, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.01.006>.

REBOLLO, M. et al. Blood and urine samples as useful sources for direct detection of tuberculosis by polimerase chain reaction. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, Wiesbaden, v.56, n. 2, p. 141-146, 2006.

REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controlo da Tuberculose. Instituto Nacional de Saúde (Org.). **Manual de Baciloscopia da Tuberculose**. Maputo: MinistÉrio da Saúde, 2012. 54 p. Disponível em: <<https://www.fhi360.org/sites/default/files/media/documents/TB%20Basiloscopy%20Manual.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

RESTREPOA, B. I. et al. Selective enrichment and detection of mycobacterial DNA in paucibacillary specimens. **Journal Microbiol Methods**, v. 67, n. 2, p. 220–229, 2006.

RIVERA, Dilia Fontalvo; CAMARGO, Doris Gómez. Genes del Mycobacterium tuberculosis involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. **Jornal de Estudantes de Medicina da Universidade Industrial de Santander**. Bucaramanga, p. 39-51. 15 dez. 2014.

Disponível em: <<http://www.scielo.org.co/pdf/muis/v28n1/v28n1a04.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2019.

ROSEMBERG, José. Tuberculose: Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 7, p.05-29, dez. 1999. Disponível em:

<http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-460X1999000200002>. Acesso em: 16 jan. 2019.

SALAZAR, M. P. **Avaliação da Nested PCR em único tubo como ferramenta diagnóstica da tuberculose**. 2012. Monografia (Bacharelado em Biomedicina) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SANTOS, Fabiana Cristina Fulco; LIRA, Laís Ariane de Siqueira; MONTENEGRO, Rosana de Albuquerque; LIMA, Juliana Figueirêdo da Costa; LIMA, Andrea Santos; SCHINDLER, Haiana Charifker; MONTENEGRO, Lílian Maria Lapa. Performance of the IS6110-TaqMan® assay in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis from different biological samples. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 51, n. 3, p. 331-337, jun. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0372-2017>.

SANTOS, F. C. F. et al. Bone tuberculosis: A case report on child. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 249–251, 2013.

SÃO PAULO. Centro de Vigilância Epidemiológica "prof. Alexandre Vranjac". Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo (Org.). **História & Curiosidades**. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/tuberculose/informacoes-sobre-tuberculose/historia-curiosidades>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN). **Banco de dados agregados do DATASUS**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/tubercpe.def> > .Acesso em 25 nov. 2020.

SMITH, I. Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 463–496, 1 jul. 2003.

SOUZA, C. G. DE et al. Pyogenic and tuberculous discitis : magnetic resonance imaging findings for differential diagnosis. **Radiol Bras**, v. 46, n. 3, p. 173–177, 2013.

STARKE, JR.; COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES. Interferon- γ release assays for diagnosis of tuberculosis infection and disease in children. **Pediatrics**, Evasnton, v. 134, n. 6, p. 1763-73, 2014.

TEIXEIRA, M. F. P. et al. Impacto orçamentário da incorporação do GeneXpert MTB/RIF para o diagnóstico da tuberculose pulmonar na perspectiva do Sistema Único de Saúde, Brasil, 2013-2017 Impacto presupuestario de la incorporación del

GeneXpert MTB/RIF para el diagnóstico de la tub. **National Health System**, v. 33, n. 9, p. 1–13, 2017.

USA. National Center For Biotechnology Information. U.s. National Library Of Medicine (Org.). **Real-Time qRT-PCR**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/>>. Acesso em: 12 abr. 2019.

RAJ WANG, Hsin-Yao et al. Development of a high sensitivity TaqMan-based PCR assay for the specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex in both pulmonary and extrapulmonary specimens. **Scientific Reports**, S.N, v. 9, n. 113, p. 1-12, 14 Jan. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6331544/>. Acesso em: 15 nov. 2020.

VALENTINE-THON, E. Quality control in nucleic acid testing-where do we stand? **Journal of Clinical Virology, Amsterdam**, v. 25, n. 3, p. 13-21 2002.

ZAMBARDI G., et al. Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infections by an ELISA-like detection of polymerase chain reaction products. **Mol Cell Probes**. v. 9, p. 91–99, 1995.

ZIMPEL, Cristina Kraemer; GUIMARÃES, Ana Marcia de Sá. **Sequenciamento, anotação e análise do genoma completo de Mycobacterium bovis cepa SP38**. 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-25072017-120925/pt-br.php>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

ZEKA, A. N.; TASBAKAN, S.; CAVUSOGLU, C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF Assay for Rapid Diagnosis of Tuberculosis and Detection of Rifampin Resistance in Pulmonary and Extrapulmonary Specimens. **J. Clin. Microbiol**, Washington, v. 49, n. 12, p. 4138-4141, dec. 2011.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos _____ o _____ (a) _____ Senhor _____ (a)

, para participar do projeto de pesquisa intitulado: “Desenvolvimento, avaliação e validação de um kit molecular baseado em PCR em tempo real com tecnologia nacional para o diagnóstico da tuberculose” que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal desta pesquisa é melhorar os exames de detecção da tuberculose doença/infecção (latente) para identificar e tratar mais rapidamente a doença.

1. Caso aceite participar neste estudo, pediremos a você:
 - a) Que forneça informações relacionadas à sua pessoa, à sua atividade profissional, ao contato com pacientes com tuberculose, e ao acompanhamento de seu estado de saúde, que poderemos conseguir perguntando diretamente a você, nas suas visitas ou por telefone, medindo seu peso e altura, e por acesso às anotações médicas e exames realizados durante o seu acompanhamento;
 - b) Que forneça 5 ml de sangue (menos de uma colher de sopa), neste mesmo dia, para fazer o exame de sangue para a infecção tuberculosa, e para as avaliações da pesquisa.
 - c) Gostaríamos também de lhe pedir para autorizar que nós possamos usar o material que sobrar das suas amostras de sangue na continuação deste trabalho, em futuros projetos de pesquisa. Essa autorização é importante caso você não ache necessário que nós o procuremos novamente para obter sua autorização no futuro explicando em que novo projeto estes restos de amostra serão utilizados. Nós asseguramos que seus dados permanecerão confidenciais, e que o comitê de ética em pesquisas avaliará o estudo a ser proposto antes que utilizemos estes restos de amostras. O fato de você não concordar neste momento com a utilização futura destes restos de amostra também não atrapalha sua participação neste estudo nem o cuidado médico que você esteja recebendo ou que possa necessitar por causa dos procedimentos realizados para a pesquisa.

Consente que utilizemos restos de suas amostras em projetos futuros?

Sim

Não

2. Caso você tenha qualquer dúvida ou queira mais informações sobre os seus resultados, nós lhe forneceremos todas as informações e explicações.

3. Os exames que não estão descritos aqui, e que lhe serão pedidos pelo seu médico, não serão realizados para a pesquisa, e são para seu cuidado médico e tratamento. Qualquer procedimento médico será autorizado e realizado apenas pela equipe médica que está lhe acompanhando. A equipe do estudo não terá nenhuma participação na decisão de realizar qualquer tipo de exame ou tratamento.

Você poderá, em qualquer tempo, desistir de participar do estudo, devendo avisar a equipe de estudo.

4. Caso você falte a alguma das coletas, mas ainda queira participar das coletas que faltam você poderá também avisar à equipe de estudo.

5. Todas as informações que permitam identificar seus resultados e seus dados serão mantidas confidenciais, com acesso apenas pela equipe de estudo. As amostras e dados registrados receberão um número específico para assegurar esse segredo. Os resultados serão divulgados na forma de publicações científicas, não permitindo a identificação individual dos participantes.

6. Qualquer teste que seja feito com suas amostras que dê resultados que possam ser úteis para seu acompanhamento e tratamento serão fornecidos a você e ao seu médico caso seja de seu interesse.

7. Estamos entregando a você uma cópia deste formulário para que possa lê-lo cuidadosamente. Estamos também lendo com você todas essas informações para que você tenha a oportunidade de tirar todas as dúvidas com a equipe do projeto, mas a qualquer momento você pode contatar a equipe e questionar e tirar dúvidas sobre o estudo.

8. A participação do(a) Senhor(a) na pesquisa poderá causar riscos, como constrangimento nas abordagens, incômodo ou dor no braço para a coleta de sangue e/ou aplicação intradérmica do PPD. Para minimizar esses riscos, os dados obtidos durante a pesquisa serão mantidos em sigilo pelos pesquisadores, assegurando ao participante a privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, de acordo com o regimento da resolução 466/12.

9. Solicitamos sua autorização para que a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) possa utilizar as informações obtidas em reuniões, congressos e publicações científicas (preservando a identidade do voluntário). E, para que possamos estocar as suas amostras biológicas, a fim de utilizá-las em estudo posterior. Neste caso, o (a) Senhor (a) será solicitado um novo consentimento, caso tenhamos que utilizar sua amostra em outra pesquisa.

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____ **data:** _____

Endereço do paciente: _____

Assinatura de testemunha: _____ **data:** _____

Assinatura do Pesquisador responsável

data:

Em caso de dúvidas, o (a) Senhor (a) poderá procurar: Romário Martins. Centro de Pesquisas AggeuMagalhães – FIOCRUZ-PE. AV. Profº Moraes Rego, S/N. Campus da UFPE. Recife/PE.
E-mail:araujo.rmartins@gmail.com Telefone: 81 2101-2569

APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA DE PESQUISA DE TUBERCULOSE

PROTOCOLO DE PESQUISA DE TUBERCULOSE

| IDENTIFICAÇÃO | | | |
|--|--|--|---|
| 1. NÚMERO DA FICHA NA PESQUISA <div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 15px; margin-top: 5px;"></div> | 2. DATA DA ENTREVISTA <div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 15px; margin-top: 5px;"></div> | | |
| 3. PROCEDÊNCIA: 1. Ambulatório <input type="checkbox"/> 2. Enfermaria <input type="checkbox"/> 3. UTI <input type="checkbox"/> | 4. NÚMERO DO PRONTUÁRIO DO HOSPITAL <div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 15px; margin-top: 5px;"></div> | | |
| 5. HOSPITAL DE ORIGEM/UNIDADE DE SAÚDE 1. Hospital das Clínicas <input type="checkbox"/> 2. Hospital Otávio de Freitas <input type="checkbox"/> 3. IMIP 4. Hospital Barão de Lucena 5. Oswaldo Cruz 6. Joaquim Cavalcanti 10. Outro: _____ | 6. NÚMERO DO SAME <div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 15px; margin-top: 5px;"></div> | | |
| 7. DATA DO DIAGNÓSTICO <div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 15px; margin-top: 5px;"></div> | | | |
| DADOS DO PACIENTE | | | |
| 8. NOME COMPLETO DO PACIENTE CONFORME RG _____ _____ | | | |
| 9. NOME DA MÃE OU RESPONSÁVEL _____ _____ | | | |
| 10. DATA DE NASCIMENTO ____/____/____ | 11. IDADE DO PACIENTE ____ anos | 12. SEXO 1. Masculino <input type="checkbox"/> 2. Feminino <input type="checkbox"/> 3. Ignorado <input type="checkbox"/> | |
| 13. ENDEREÇO / LOGRADOURO _____ _____ | | | |
| PONTO DE REFERÊNCIA _____ | | | |
| 14. BAIRRO _____ | 15. CIDADE _____ | 16. UF <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px; margin-top: 5px;"></div> | 17. ZONA / ÁREA 1. Urbana <input type="checkbox"/> 3. Periurbana <input type="checkbox"/> 2. Rural <input type="checkbox"/> 4. Ignorado <input type="checkbox"/> |
| 18. TEL. RES. E CELULAR (____) _____ - _____ (____) _____ - _____ | 19. CEP <div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 15px; margin-top: 5px;"></div> | 20. RAÇA / COR 1. Branca <input type="checkbox"/> 4. Parda <input type="checkbox"/> 2. Preta <input type="checkbox"/> 5. Indígena <input type="checkbox"/> 3. Amarela <input type="checkbox"/> 6. Ignorado <input type="checkbox"/> | |
| DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS | | | |
| 21. GRAU DE INSTRUÇÃO DO PACIENTE 1. Analfabeto <input type="checkbox"/> 4. 2º grau <input type="checkbox"/> 2. Iniciou alfabetização <input type="checkbox"/> 5. 3º grau <input type="checkbox"/> 3. 1º grau <input type="checkbox"/> 6. Outro: _____ | | 22. RENDA FAMILIAR MENSAL 1. Menor ou igual a 1 salário mínimo <input type="checkbox"/> 4. Outro: _____ <input type="checkbox"/> 2. De 2 a 4 salários mínimos <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 3. Mais que 5 salários mínimos <input type="checkbox"/> | |
| 23. QUANTAS PESSOAS MORAM NA CASA DO PACIENTE? 1. Até 3 <input type="checkbox"/> 2. De 4 a 6 <input type="checkbox"/> 3. Mais de 6 <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> | 24. QUANTOS ADULTOS? 1. Até 2 <input type="checkbox"/> 2. De 3 a 5 <input type="checkbox"/> 3. Mais que 5 <input type="checkbox"/> | 25. QUANTAS CRIANÇAS? 1. Até 2 <input type="checkbox"/> 2. De 3 a 5 <input type="checkbox"/> 3. Mais que 5 <input type="checkbox"/> | |

| | |
|--|---|
| 26. QUANTOS CÔMODOS (LOCAIS DE DORMIR) TÊM NA CASA? 1. Um 2. De 2 a 4 <input type="checkbox"/> 3. Mais de 4 8. Não sabe informar | |
| DADOS EPIDEMIOLÓGICOS | |
| 27. EXISTE ALGUM CASO DE TUBERCULOSE NA FAMÍLIA OU EM PESSOA DE CONVÍVIO? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 37. Caso sim, há quanto tempo? _____ <i>Caso a resposta seja NÃO, seguir para 34</i> | 28. O CASO FOI CONFIRMADO? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 9. Inaplicável <i>Caso a resposta seja NÃO, pular para 33.</i> |
| 29. O CASO FOI CONFIRMADO POR BACIOSCOPIA E/OU CULTURA? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 9. Inaplicável | 30. QUAL O GRAU DE PARENTESCO? 1. Mãe 6. Primo (a) 2. Pai 7. Outro: _____ 3. Irmã (o) 8. Não sabe informar 4. Avô (ô) 9. Inaplicável 5. Tio (a) 10. Filho (a) |
| 31. QUAL O TIPO DE CONTATO? 1. Intradomiciliar contínuo (5 a 7 dias/semana, > 6h/dia) 2. Intradomiciliar intermitente (5 a 7 dias/semana, < 6h/dia) 3. Esporádico (entre 2 a 4 dias/semana) 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável | 32. EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO PARA TB O CONTATO: 1. Foi tratado totalmente <input type="checkbox"/> 2. Está em tratamento 3. Não tratado 4. Interrompeu o tratamento 8. Não sabe informar 9. Inaplicável <i>Caso não tenha havido interrupção, seguir para 39.</i> |
| 33. QUAL O MOTIVO DA INTERRUPÇÃO: 1. Intolerância ao medicamento 2. Falta de medicamento 3. Abandono do tratamento <input type="checkbox"/> 4. Outro motivo 8. Não sabe informar 9. Inaplicável | |
| ANTECEDENTES DO PACIENTE | |
| 34. TEM DOENÇA DE BASE E AGRAVOS ASSOCIADOS? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar <i>Caso a resposta seja NÃO, seguir para 36.</i> | 35. QUAL DOENÇA? 1. Asma 6. Fibrose Cística 11. Doença mental 2. Pneumonia 7. HIV/AIDS 12. Câncer <input type="checkbox"/> 3. Bronquite 8. Não sabe 4. Tuberculose 9. Inaplicável 5. Diabetes 10. Outro: _____ |
| 36. TEM CICATRIZ DE BCG? (VISTA PELO ENTREVISTADOR NO BRAÇO DIREITO OU ATRAVÉS DE CARTÃO) 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não verificado | 37. FEZ PPD? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe Data de realização: ____/____/____ (Vê no cartão) <i>Caso NÃO tenha feito, seguir para 39.</i> |

| EXAMES LABORATORIAIS (preenchido pelo médico pesquisador) | | |
|---|---|---|
| 54. REALIZOU RAIOS X DE TÓRAX NA ADMISSÃO? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar Data: ___/___/___ <i>Caso a resposta seja NÃO, seguir para 54</i> | 55. RESULTADO DO RAIOS X DE ADMISSÃO: 1. Normal <input type="checkbox"/> 2. Alterado <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar | - SE ALTERADO: 1. Padrão não sugestivo de TB 2. Forma Pneumônica <input type="checkbox"/> 3. Forma Pneumoganglionar 4. Forma Pleuropulmonar 5. Forma Miliar 6. Forma Ganglionar 7. Inaplicável 8. Não sabe informar |
| 56. REALIZOU RAIOS X DE TÓRAX DE CONTROLE? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar Data: ___/___/___ <i>Caso a resposta seja Não, seguir para 56</i> | 57. RESULTADO DO RAIOS X DE CONTROLE: 1. Normalizou <input type="checkbox"/> 2. Houve melhora <input type="checkbox"/> 3. Houve piora <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 9. Inaplicável | 58. REALIZOU TOMOGRAFIA DE TÓRAX? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar Data: ___/___/___ <i>Caso a resposta seja Não, seguir para 68.</i> |
| 59. RESULTADO DA TOMOGRAFIA DE TÓRAX: 1. Normal <input type="checkbox"/> 2. Alterado sugestivo <input type="checkbox"/> 3. Alterado inespecífico <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 9. Inaplicável | 60. REALIZOU BACILOSCOPIA? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ___/___/___ <i>Caso a resposta seja NÃO, seguir para 63.</i> | 61. RESULTADO DA BACILOSCOPIA: 1. Positiva <input type="checkbox"/> 2. Negativa <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável _____ Cruzes |
| 62. REALIZOU CULTURA? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ___/___/___ | 63. RESULTADO POR AMOSTRA BIOLÓGICA (NESTED-PCR ÚNICO TUBO): 1. <input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/> 6. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio <input type="checkbox"/> 2. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/> 7. <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/> 3. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/> 8. <input type="checkbox"/> Outros: _____ <input type="checkbox"/> 4. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural <input type="checkbox"/> 9. <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/> 1. Sim 2. Não | |
| 64. DIAGNÓSTICO INICIAL 1. TB infecção <input type="checkbox"/> 2. TB doença <input type="checkbox"/> 3. TB suspeita <input type="checkbox"/> 4. Não é TB | 65. DATA DA NOTIFICAÇÃO: Data: ___/___/___ Profissional que notificou: _____ | 66. DIAGNÓSTICO FINAL 1. TB infecção <input type="checkbox"/> 2. TB doença <input type="checkbox"/> 3. TB suspeita <input type="checkbox"/> 4. Não é TB |
| 67. TEMPO ENTRE O INÍCIO DOS SINTOMAS E O DIAGNÓSTICO DE TB NO SERVIÇO DE SAÚDE: 1. ≤ 1 mês <input type="checkbox"/> 3. ≥ 3 meses <input type="checkbox"/> 2. 1 - 3 meses <input type="checkbox"/> 4. Não investigado | 68. FORMA DE TB 1. Pulmonar <input type="checkbox"/> 2. Extra pulmonar <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar | - SE EXTRA PULMONAR: 1. Ganglionar Periférica <input type="checkbox"/> 6. Pleural <input type="checkbox"/> 2. Geniturinária <input type="checkbox"/> 7. Cutânea <input type="checkbox"/> 3. Meningoencefálica <input type="checkbox"/> 8. Ocular <input type="checkbox"/> 4. Miliar <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> 5. Óssea <input type="checkbox"/> 10. Laringea |

| | |
|---|--|
| 69. TRATAMENTO REALIZADO: | |
| 1. Quimioprofilaxia (INH por 6 meses) | 4. Esquemas Especiais (EE) C/ ou s/ doença hepática prévia |
| 2. Esquema Básico (EB - 2RHZE/4RH) | 5. Esquemas de Resistência (Mono, Multi e Extremamente Resistente) |
| 3. Esquema para Meningoencefalite (EM - 2RHZE/7RH) | 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> |
| EVOLUÇÃO | |
| 70. RESPOSTA AO TRATAMENTO ESPECÍFICO (FEITA PELO MÉDICO ACOMPANHANTE) | - FORMA: |
| 1. Melhora clínica evidente após 30 dias de início do tratamento (Resposta ao tratamento) | 1. Pulmonar <input type="checkbox"/> |
| 2. Não houve melhora clínica evidente após 30 dias de início do tratamento (Não houve resposta ao tratamento) | 2. Extrapulmonar |
| 8. Inaplicável <input type="checkbox"/> | 3. Pulmonar + Extrapulmonar |
| | 4. Infecção Latente (ILTb) |
| • Entrevistador: | • Assinatura: |
| • _____ | • _____ |

| | | | |
|---|---|---|--------------------------------|
| DIAGNÓSTICO MOLECULAR | | | |
| 71. REALIZOU NESTED-PCR ÚNICO TUBO PRÉ-TRATAMENTO? | 72. RESULTADO POR AMOSTRA BIOLÓGICA (NESTED-PCR ÚNICO TUBO): | | |
| 1. Sim <input type="checkbox"/> | 1. <input type="checkbox"/> Leucócitos <input type="checkbox"/> | 6. <input type="checkbox"/> Liq. Pleural <input type="checkbox"/> | 1. Sim 2. Não |
| 2. Não <input type="checkbox"/> | 2. <input type="checkbox"/> Plasma <input type="checkbox"/> | 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio <input type="checkbox"/> | |
| Data: ____/____/____ | 3. <input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/> | 8. <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/> | |
| | 4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/> | 9. <input type="checkbox"/> Outros: _____ <input type="checkbox"/> | |
| | 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/> | 10. <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/> | |
| 73. REALIZOU PCR COLORIMÉTRICA PRÉ-TRATAMENTO? | 74. RESULTADO POR AMOSTRA BIOLÓGICA (PCR COLORIMÉTRICA): | | |
| 1. Sim <input type="checkbox"/> | 1. <input type="checkbox"/> Leucócitos <input type="checkbox"/> | 6. <input type="checkbox"/> Liq. Pleural <input type="checkbox"/> | 1. Sim 2. Não |
| 2. Não <input type="checkbox"/> | 2. <input type="checkbox"/> Plasma <input type="checkbox"/> | 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio <input type="checkbox"/> | |
| Data: ____/____/____ | 3. <input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/> | 8. <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/> | |
| | 4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/> | 9. <input type="checkbox"/> Outros: _____ <input type="checkbox"/> | |
| | 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/> | 10. <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/> | |
| 75. REALIZOU qPCR PRÉ-TRATAMENTO? | 76. RESULTADO POR AMOSTRA BIOLÓGICA (qPCR): | | |
| 1. Sim <input type="checkbox"/> | 1. <input type="checkbox"/> Leucócitos <input type="checkbox"/> | 6. <input type="checkbox"/> Liq. Pleural <input type="checkbox"/> | 1. Sim 2. Não |
| 2. Não <input type="checkbox"/> | 2. <input type="checkbox"/> Plasma <input type="checkbox"/> | 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio <input type="checkbox"/> | |
| Data: ____/____/____ | 3. <input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/> | 8. <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/> | |
| | 4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/> | 9. <input type="checkbox"/> Outros: _____ <input type="checkbox"/> | |
| | 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/> | 10. <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/> | |

RESPONSÁVEL PELO PREENCHIMENTO DA FICHA: _____
TELEFONE PARA CONTATO: () _____ - _____ / () _____ - _____
RESPONSÁVEL PELOS EXAMES MOLECULARES: _____

ANEXO A – PARECER SUBSTANCIADO DO COMITÉ DE ÉTICA E PESQUISA – IAM/FIOCRUZ



CENTRO DE PESQUISAS
AGGEU MAGALHÃES/



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento, avaliação e validação de um kit molecular baseado em PCR em tempo real com tecnologia nacional para o diagnóstico da tuberculose

Pesquisador: Haiana Charifker Schindler

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45739715.7.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz [inativa]

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.489.477

Apresentação do Projeto:

O presente estudo irá avaliar o desempenho da qPCR com insumos nacionais em comparação com os importados. A partir desta análise, pretende-se padronizar, avaliar e validar um protótipo da qPCR com tecnologia nacional para ser utilizado nos serviços de referência da Rede SUS após a análise de custoefetividade. O estudo será desenvolvido no Laboratório de Imunoepidemiologia do CPqAM/FIOCRUZ. Os indivíduos serão provenientes dos principais Serviços de Referência para Tuberculose do SUS. Os participantes da pesquisa serão indivíduos com suspeita de TB (pulmonar e extrapulmonar), acompanhados prospectivamente e de maneira duplo-cega. O diagnóstico final e a forma clínica da doença serão definidos pelo médico assistente do serviço de saúde sem qualquer interferência dos testes moleculares. Os pacientes serão alocados em 4 grupos de acordo com os critérios clínico-epidemiológicos e laboratoriais: Grupo TB doença (pulmonar e extrapulmonar, Grupo com TB provável (pulmonar e extrapulmonar, Grupo sem TB (controle negativo) 1: Pacientes sem TB saudáveis; Grupo sem TB (controle negativo) 2: Pacientes sem TB que procuraram o serviço de saúde por outra doença, com quadro clínico e laboratorial não compatível com a TB e epidemiologia negativa para TB. De todos os pacientes serão coletados 3 amostras de urina e uma amostra de sangue. Dependendo da forma clínica da tuberculose, poderá ser necessária a inclusão

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE **Município:** RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



CENTRO DE PESQUISAS
AGGEU MAGALHÃES/



Continuação do Parecer: 1.489.477

de um terceiro tipo de amostra biológica (escarro, biópsia, LCR, entre outras).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo

- Finalizar a validação do teste baseado em PCR em tempo real in house (qPCR) para o diagnóstico da tuberculose em pacientes atendidos na rede SUS de Pernambuco;
- Estabelecer parceria com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná/Instituto de Tecnologia do Paraná (IBMP/TECPAR) para produção dos insumos nacionais a serem utilizados na qPCR nacional;
- Avaliar o uso dos reagentes nacionais e importados no desempenho do teste molecular;
- Analisar a possibilidade de substituição dos reagentes importados por nacionais para a elaboração de um kit de qPCR para detecção de M. tuberculosis em amostras clínicas de escarro, sangue e urina;
- Avaliar a acurácia do protótipo molecular em pacientes com dificuldade diagnóstica portadores de formas paucibacilares da doença (TB infantil, TB pulmonar com baciloscopia negativa, TB extrapulmonar e TB/HIV);
- Validar o protótipo da qPCR em multicêntricos e determinar a reprodutibilidade e estabilidade do mesmo;
- Estabelecer o custo x efetividade do kit de qPCR nacional com a da qPCR usando insumos importados e com o teste molecular rápido GeneXpert Mtb/RIF.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A não aceitação dos pacientes em aceitar a participação no projeto; o incomodo causado pela perfuração no ato da coleta de sangue.

Benefícios:

- Produção de um kit de qPCR com insumos nacionais de menor custo-efetividade em relação a outros testes moleculares existentes no comércio e
- obtenção de parceria com o IBMP/TECPAR para propor uma solução inovadora para o diagnóstico da tuberculose em serviços do SUS;
- Implementação de uma ferramenta molecular nacional e de baixo custo que possa auxiliar o diagnóstico clínico dos casos difíceis de elucidação pelos exames bacteriológicos de rotina, sobretudo em pacientes vulneráveis;
- Evidências em termos de custos, efetividade e impacto econômico de uma estratégia inovadora no diagnóstico da tuberculose para o serviço de saúde/SUS;

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



CENTRO DE PESQUISAS
AGGEU MAGALHÃES/



Continuação do Parecer: 1.489.477

- Detecção de casos e início de tratamento tuberculostático mais precocemente, com conseqüente diminuição dos casos de resistência, do tempo de transmissão da doença e do número de pessoas infectadas pelo indivíduo doente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É um projeto relevante que fará um estudo transversal e prospectivo do teste diagnóstico para tuberculose na fase II-III da classificação de SACKETT e HAYNES (2002), com produção de um kit de qPCR com insumos nacionais. O estudo favorecerá uma articulação entre pesquisadores, profissionais de saúde e sociedade civil, possibilitando um aumento da sensibilização, captação e diagnóstico, sobretudo de casos omissos e de contatos domiciliares e peridomiciliares dos pacientes com tuberculose ativa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A proponente do projeto acatou todas as sugestões e solicitações feitas pelo comitê na última análise do CEP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está apto para sua execução.

Considerações Finais a critério do CEP:

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 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|----------------|-----------------------------|------------|-------|----------|
| Informações | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P | 26/02/2016 | | Aceito |

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



CENTRO DE PESQUISAS
AGGEU MAGALHÃES/



Continuação do Parecer: 1.489.477

| | | | | |
|--|-------------------------------|------------------------|-------------------------------|--------|
| Básicas do Projeto | UTO_527652.pdf | 14:10:32 | | Aceito |
| Folha de Rosto | FolhadedeRosto.pdf | 26/02/2016 14:10:13 | Haiana Charifker Schindler | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | NovoProjetoPesquisaCEP.pdf | 26/02/2016 14:09:29 | Haiana Charifker Schindler | Aceito |
| TCLL / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | NovoTALLGrupoMenor18anos.pdf | 26/02/2016 14:08:50 | Haiana Charifker Schindler | Aceito |
| TCLL / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | NovoTCLL:GrupMaior18anos.pdf | 26/02/2016 14:08:30 | Haiana Charifker Schindler | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | CartaAnuenciaSecretariaES.pdf | 26/02/2016 14:08:10 | Haiana Charifker Schindler | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | CartaAnuenciaBMP.pdf | 26/02/2016 14:07:56 | Haiana Charifker Schindler | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | CartaAnuenciaBaraoLucena.pdf | 26/02/2016 14:07:40 | Haiana Charifker Schindler | Aceito |
| Outros | CartaRespostaCEP.pdf | 26/02/2016 14:07:25 | Haiana Charifker Schindler | Aceito |

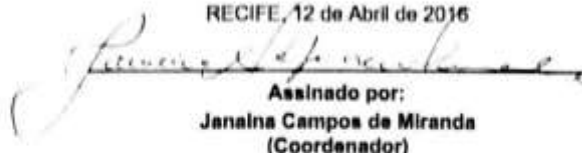
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 12 de Abril de 2016



Assinado por:
Janaina Campos de Miranda
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Moraes Rogo, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comissao@cpqam.fiocruz.br

ANEXO B – CTS OBTIDOS PARA AMOSTRAS DO GRUPO “SEM TUBERCULOSE” (NEGATIVAS PARA DETECÇÃO DE *M. TUBERCULOSIS*) UTILIZANDO A QPCR COM INSUMOS NACIONAIS E IMPORTADOS

| Diagnóstico | Amostra | qPCR Nacional | qPCR Importada |
|-------------|------------|---------------------------|----------------|
| | | Ct (detecções replicatas) | |
| | | IS6110 | IS6110 |
| Sem TB | Plasma | 35,53 | 37,0(2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | NA | 35,9(2/2) |
| Sem TB | Urina | 33,44 | 37,2(2/2) |
| Sem TB | Plasma | 35,15 | 37,3(2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | NA | 36,4(2/2) |
| Sem TB | Urina | 34,26 | 37,8(2/2) |
| Sem TB | Plasma | 33,92 | 36,9(2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | NA | NA(2/2) |
| Sem TB | Urina | 34,58 | 33,9(2/2) |
| Sem TB | Plasma | 33,74 | 35,5(2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | 35,29 | 34,5(2/2) |
| Sem TB | Urina | NA | 38,3(2/2) |
| Sem TB | Urina | 31,67 | 34,2(2/2) |
| Sem TB | Plasma | NA | 36,6(2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | 35,20 | 33,9(2/2) |
| Sem TB | Urina | 34,93 | 38,0(2/2) |
| Sem TB | Plasma | 33,63 | 37,4(2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | NA | 37,7(2/2) |
| Sem TB | Plasma | 33,58 | NA (2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | 33,20 | 34,2(2/2) |
| Sem TB | Urina | 33,90 | 37,9(2/2) |
| Sem TB | Plasma | 31,94 | 36,2(2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | 34,76 | 37,3(2/2) |
| Sem TB | Urina | 34,46 | 39,1(2/2) |
| Sem TB | Plasma | 33,99 | 38,2(2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | 34,79 | 35,9(2/2) |

| Diagnóstico | Amostra | qPCR | qPCR |
|-------------|-------------------------------|---------------------------|------------|
| | | Nacional | Importada |
| | | Ct (detecções replicatas) | |
| | | IS6110 | IS6110 |
| Sem TB | Urina | 33,90 | 38,0(2/2) |
| Sem TB | Escarro | NA | 38,3(2/2) |
| Sem TB | Escarro | NA | 38,7(2/2) |
| Sem TB | Escarro | 36,00 | 35,9(2/2) |
| Sem TB | Escarro | 34,25 | 36,3(2/2) |
| Sem TB | Escarro | 35,30 | 39,0(2/2) |
| Sem TB | Escarro | 34,2 | 36,0 (2/2) |
| Sem TB | Líquidopleural | 34,8 | 36,0 (2/2) |
| Sem TB | Líquidoascítico | 36,5 | 36,0 (2/2) |
| Sem TB | Líquido peritonial | NA | 36,0 (2/2) |
| Sem TB | Líquido cefalorraqui diano | 34,7 | 36,0 (2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | NA | 34,0 (2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | NA | 33,7 (2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | 35,0 | 35,0 (2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | NA | 33,8 (2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | NA | 34,1 (2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | 39,3 | 36,0 (2/2) |
| Sem TB | Leucócitos | NA | 36,0 (2/2) |
| Sem TB | Plasma | 34,9 | 36,0 (2/2) |
| Sem TB | Plasma | 35,7 | 37,0 (2/2) |
| Sem TB | Plasma | 34,7 | 34,0 (2/2) |
| Sem TB | Plasma | 35,9 | 36,0 (2/2) |
| Sem TB | Urina | 33,8 | 35,0 (2/2) |
| Sem TB | Urina | NA | 34,0 (2/2) |
| Sem TB | Urina | 35,3 | 36,0 (2/2) |
| Sem TB | Urina | 34,5 | 33,0 (2/2) |
| Sem TB | Urina | 34,0 | 36,0 (2/2) |
| Sem TB | Urina | 34,9 | 37,0 (2/2) |

| Diagnóstico | Amostra | qPCR Nacional | qPCR Importada |
|-------------|--------------------|---------------------------|----------------|
| | | Ct (detecções replicatas) | |
| | | IS6110 | |
| Sem TB | LBA | 35,3 | 35,0 (2/2) |
| Sem TB | Líquido peritonial | NA | 36,0 (2/2) |

Fonte: Tabela feita pela autora, 2020.

**ANEXO C – CTS OBTIDOS PARA AMOSTRAS DO GRUPO “TUBERCULOSE
EXTRAPULMONAR” (POSITIVAS PARA DETECÇÃO DE *M. TUBERCULOSIS*)**

UTILIZANDO A QPCR COM INSUMOS NACIONAIS E IMPORTADOS

| Diagnóstico | Amostra | qPCR Nacional | qPCR Importada |
|---------------------|----------------|---------------------------|-------------------|
| | | Ct (detecções replicatas) | |
| | | IS6110 | IS6110 |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 28.7 ± 0.1 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 28.59 ± 0.04 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 31.51 ± 0.04 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 33.16 ± 0.37 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 31.96 ± 0.05 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 30.74 ± 0.18 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 31.92 ± 0.29 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | LíquidoPleural | 30.85 ± 0.23 (3/3) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 30.98 ± 0.24 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 28.91 ± 0.08 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 29.58 ± 0.22 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 28.87 ± 0.07 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 31.71 ± 0.27 (3/3) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 34.46 ± 0.08 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 29.03 ± 0.26 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | LíquidoPleural | 31.01 ± 0.15 (3/3) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 34.84 ± 0.42 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 29.27 ± 0.18 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 27.64 ± 0.18 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 27.64 ± 0.48 (3/3) | 29,0 (2/2) |

| Diagnóstico | Amostra | qPCR Nacional | qPCR Importada |
|---------------------|------------|---------------------------|-------------------|
| | | Ct (detecções replicatas) | |
| | | IS6110 | IS6110 |
| TB Extrapulmonar | Urina | 30.86 ± 0.25 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 33.65 ± 0.39 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 33.97 ± 0.1 (3/3) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 36.23 ± 0.55 (3/3) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 25,5 ± 0,12 (2/2) | 28,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 35,7 ± 0,76 (2/2) | 33,9 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 33,0 ± 0,29(2/2) | 31,1 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 26,5 ± 0,39(2/2) | 34,1 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 26,3 ± 0,06(2/2) | 33,8 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 29,7 ± 0,07(2/2) | 29,5 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 29,4 ± 0,21(2/2) | 30,1 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 33,5 ± 0,59(2/2) | 34,6 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 31,4 ± 0,02(2/2) | 32,3 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 24,8 ± 0,01(2/2) | 34,1 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 23,7 ± 0,16(2/2) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 30,5 ± 0,69(2/2) | 35,1 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 27,5 ± 0,00(2/2) | 31,5 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | 35,1 ± NA(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | NA ± NA(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Leucócitos | NA ± NA(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 30,3 ± 0,03(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 32,2 ± 0,08(2/2) | 36,0 (2/2) |

| Diagnóstico | Amostra | qPCR Nacional | qPCR Importada |
|---------------------|---------|---------------------------|-------------------|
| | | Ct (detecções replicatas) | |
| | | IS6110 | IS6110 |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 28,9 ±0,08(2/2) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 29,3 ±0,12(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 29,5 ±0,11(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 26,6 ±0,02 (2/2) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | NA ± NA(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 30,7 ±0,07(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 24,9 ±0,07(2/2) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 27,5 ±0,15(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 27,7 ±0,05(2/2) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | NA ± NA(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 27,3 ±0,08(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Plasma | 26,0 ±0,03(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 30,5 ±0,27(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 31,7 ±0,68(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 28,4 ±0,03(2/2) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 30,8 ±0,23(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 26,7 ±0,02(2/2) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 23,8 ±0,07(2/2) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 26,6 ±0,12(2/2) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 25,9 ±0,28(2/2) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 26,7 ±0,02(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 33,0 ±0,80(2/2) | 36,0 (2/2) |

| Diagnóstico | Amostra | qPCR Nacional | qPCR Importada |
|---------------------|---------------------|---------------------------|-------------------|
| | | Ct (detecções replicatas) | |
| | | IS6110 | IS6110 |
| TB Extrapulmonar | Urina | 27,0 ±0,09(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 27,3 ±0,18(2/2) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Urina | 31,5 ±0,46(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Escarro | 36,4 ±0,03(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Líquido pleural | 31,1 ±0,08(2/2) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Líquido pleural | NA ± NA(2/2) | 36,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Líquido Ascítico | 32,2 ±0,34(2/2) | 29,0 (2/2) |
| TB Extrapulmonar | Biópsia | NA ± NA(2/2) | 36,0 (2/2) |

Fonte: Tabela feita pela autora, 2020.