

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

KLARISSA MIRANDA GUARINES

**AVALIAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NA
DETECÇÃO DO *Mycobacterium tuberculosis* EM DIFERENTES AMOSTRAS
BIOLÓGICAS**

Recife

2015

KLARISSA MIRANDA GUARINES

**AVALIAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NA
DETECÇÃO DO *Mycobacterium tuberculosis* EM DIFERENTES AMOSTRAS
BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira

Co-orientadora: Dr^a Haiana Charifker Schindler

RECIFE

2015

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- G915a Guarines, Klarissa Miranda.
Avaliação de duas técnicas de reação em cadeia da polimerase na detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em diferentes amostras biológicas / Klarissa Miranda Guarines. - Recife: s.n, 2015.
84 p. : ilus., tab.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.
Orientadora: Sheilla Andrade de Oliveira; co-orientadora: Haiana Charifker Schindler.
1. Tuberculose pulmonar - diagnóstico. 2. Reação em Cadeia da Polimerase - métodos. 3. Valor Preditivo dos Testes . 4. Sensibilidade e Especificidade. I. Oliveira, Sheilla Andrade de. II. Schindler, Haiana Charifker. III. Título.

CDU 616-002.5

KLARISSA MIRANDA GUARINES

**AVALIAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NA
DETECÇÃO DO *Mycobacterium tuberculosis* EM DIFERENTES AMOSTRAS
BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do Centro de
Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz, como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Data de aprovação: 06/03/2015

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dr^a Sílvia Maria Lucena Montenegro

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dr^a Lílian Maria Lapa Montenegro

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

À minha mãe Cárley, minha irmã Gabriela
E minha tia Breyze.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para conseguir desempenhar todas as minhas responsabilidades da melhor maneira que pude, me dedicando sempre ao máximo, e chegar até aqui. Com fé podemos realizar tudo que desejamos.

Agradeço à minha família. À minha mãe Cárley pelos ensinamentos desde quando era criança, pela pressão que me fez ser uma pessoa melhor, pela doação e esforço à criação das suas duas filhas e por ser um exemplo. À minha irmã Gabriela por me amar, e me apoiar nos meus piores momentos, mesmo que do seu jeito que só eu consigo entender. À minha tia e madrinha Breyze pelos conselhos, pela calma quando todos parecem estar nervosos, por tudo que me fez crescer ainda mais. E por trazer às nossas vidas um anjo iluminado que nos deixa mais felizes a cada dia: João, meu primo.

Obrigada às minhas orientadoras Dra. Haiana Schindler por me receber desde a iniciação científica nas dependências do seu laboratório, me introduzindo à ciência e proporcionando tantos ensinamentos desse mundo para mim. Obrigada pela oportunidade e por me mostrar o quão aprecio a carreira acadêmica e de pesquisa. E à Dra. Sheilla Oliveira, pela incrível oportunidade de cursar o tão desejado Mestrado Acadêmico de Biociências e Biotecnologia em Saúde, obrigada por tudo passado para mim, e pelos momentos de calma durante meus picos de estresse, você certamente é uma pesquisadora incrível.

Agradeço a eterna equipe do Laboratório de Imunoepidemiologia, que sinto falta todo dia na minha rotina, bem como aos agregados, pelo suporte, amizade, apoio: Andrea, Bruna, Fabiana, Laís, Neide, Heidi, Gabi, Rosana, Marcela, Aline, Lílian, Juliana, Cibely, Romero, André. Aos novatos que me ajudaram na reta final: Léo, Ananda, Rayssa e Bonifácio. Sem vocês, eu não conseguiria. Agradeço em especial às Mestres Laís Lira e Fabiana Fulco pelo suporte técnico e ensinamentos na PCR em tempo real, à Dra. Juliana Figueiredo pelas dicas na Nested PCR em único tubo e em estatística, à Aline Peixoto pelo suporte técnico na Nested PCR em único tubo, além da ajuda no resgate de dados, e ao Dr. Romero Henrique pelo excepcional apoio na dissertação, desde a qualificação. Desculpem o aperseio e obrigada por todo apoio emocional!

Agradeço à minha turma de Biomedicina da UFPE, em especial aos que permaneceram comigo até o Mestrado, e aos novos amigos que fiz na turma do Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do CPqAM. Sempre dando uma mãozinha onde puderam me ajudar, e dando aquele apoio nos desabafos, sendo essenciais na minha jornada até o final!

Agradeço também aos meus novos companheiros de trabalho: Bruna, Paulo, Jura, Nathy, Marcelinha e Val, no LACEN/PE, que conseguiram aturar minhas loucuras diárias e desesperos constantes. Amadureci bastante nesse ano que passamos juntos, e graças a esse amadurecimento consegui manter o máximo de calma possível onde nunca conseguiria. Obrigada pela força, pelo amor, pelas palavras de amizade, de fé, e pela compreensão.

Agradeço ao meu namorado, Felipe, que mais uma vez aguentou a barra da escrita de um trabalho de conclusão de curso, me dando muita força para atingir meus objetivos. Obrigada por me aceitar como sou, perfeccionista e com minhas agonias, e por me fazer acreditar que sou capaz de alcançar o que desejo. Obrigada por me amar e me fazer crescer, e por dizer que eu sou fera!

Agradeço ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela estrutura que utilizei para esse projeto. E ao PDTIS por financiar o mesmo.

Obrigada!

*"Muitos homens devem a grandeza da sua vida
aos obstáculos que tiveram que vencer."*

(C. E. Spurgeon)

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

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* e que permanece como um importante problema de saúde pública mundial, sendo a TB pulmonar a forma mais comum de apresentação da doença. O diagnóstico precoce e tratamento adequado são essenciais para a eficácia dos programas públicos de controle da TB. Novas metodologias mais rápidas, sensíveis e específicas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), vem sendo propostas no diagnóstico da doença. O objetivo desse estudo foi avaliar o desempenho de duas PCR, a PCR em tempo real (qPCR) e a Nested PCR em único tubo (STNPCR), em diferentes amostras biológicas, no diagnóstico da tuberculose pulmonar, além de compará-las com as metodologias convencionais (baciloscopia e cultura) e entre si. Para isso foram analisados 125 pacientes que tiveram amostras de sangue (125 amostras de plasma e 116 amostras de PBMC), urina (n=125) e escarro (n=125) coletadas, totalizando a análise de 491 amostras biológicas. Amostras de escarro e urina foram descontaminadas pelo método de Petroff NaOH 4% modificado e semeadas em meio de cultura Löwenstein-Jensen (LJ), enquanto as amostras de sangue eram separadas em plasma e PBMC. Após processamento, deu-se a extração de DNA através do kit comercial da Qiagen seguida de amplificação pelas duas metodologias de PCR. Para análise estatística calculou-se a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e índice kappa das técnicas. A STNPCR apresentou, em amostras de sangue, sensibilidade de 26,3% e especificidade de 97,7%. Em amostras de urina observou-se uma S = 7,9% e E = 98,9% e em escarro S = 21,1% e E = 98,9%. Quando analisadas as amostras em paralelo, a sensibilidade da STNPCR foi igual a 44,7% enquanto sua especificidade foi 97,7%. Já a qPCR, em amostras de sangue, obteve sensibilidade igual a 26,3% e especificidade de 95,4%. Em amostras de urina a sensibilidade obtida foi 47,4% e a especificidade 79,3% e, em escarro, S = 36,8% e E = 95,4%. Quando analisada em paralelo, a sensibilidade da qPCR foi 65,8% e a especificidade foi 79,3%. A baciloscopia de escarro apresentou sensibilidade de 41,7% e especificidade de 100%, enquanto as culturas em urina e escarro apresentaram sensibilidade e especificidade, respectivamente, de 10,5% e 100% e 60,5% e 96,6%. Pode-se concluir que a qPCR apresentou melhor desempenho quando comparada à STNPCR e também bom desempenho quando comparada às metodologias convencionais, e que quando analisa-se mais de um tipo de amostras biológica, a eficácia das técnicas é aumentada. Espera-se que com a utilização dessa técnica molecular, seja possível a melhor elucidação dos casos de TB pulmonar, promovendo maior taxa de tratamento dos pacientes e menor risco de transmissão da doença.

Palavras-chave: Tuberculose pulmonar, PCR, diagnóstico

GUARINES, Klarissa Miranda. **Evaluation of two polymerase chain reaction assays in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in different biological samples.** 2015. Dissertation (Master Degree in Biosciences and Biotechnology) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* that remains as an important public health problem worldwide, pulmonary TB is the most common form of the disease presentation. Early diagnosis and treatment are essential to the effectiveness of public programs to control TB. New, faster, sensitive and specific methods as the polymerase chain reaction (PCR) are being proposed as diagnosis for the disease. The aim of this study was to evaluate two PCR performance, real-time PCR (qPCR) and single tube nested PCR (STNPCR) in different biological samples in the diagnosis of pulmonary tuberculosis, and compare them with the conventional methodologies (smear and culture) and between themselves. To this was analyzed 125 patients who had blood samples (125 plasma samples and 116 PBMC samples), urine (n=125) and sputum (n=125) collected, analyzing 491 biological samples. Urine and sputum samples were processed by Petroff NAOH 4% modified method and cultured in Löwenstein-Jensen (LJ) medium, while blood samples were divided in plasma and PBMC. After processing, DNA was extracted by commercial kit from Qiagen following by amplification using the two PCR methodologies. For statistical analysis, it was calculated sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and kappa index. The STNPCR presented in blood samples, sensitivity 26.3 and specificity of 97.7%. In PBMC sensitivity was 13.5% and the specificity was 98.7%. In urine samples there was a Se = 7.9% Sp = 98.9% and in sputum and Se = 21.1% and Sp = 98.9%. When analyzed samples in parallel, the sensitivity of STNPCR was equal to 44.7%, while its specificity was 97.7%. While qPCR in blood samples obtained sensitivity of 26.3% and specificity of 95.4%. In the urine samples was observed sensitivity and specificity of 47.4% and 79.3%, sputum, Se = 36.8% and Sp = 95.4%. When analyzed in parallel, the qPCR sensitivity was 65.8% and the specificity was 79.3%. Sputum smear microscopy had a sensitivity of 41.7% and specificity of 100%, while urine and sputum cultures showed sensitivity and specificity, respectively, 10.5% and 100% and 60.5% and 96.6%. It can be concluded that qPCR had a better performance when compared to STNPCR and also good performance when compared to conventional methods, and that when analyzing more than one type of biological samples, the effectiveness of the techniques is increased. It is expected that the use of such molecular technique helps the elucidation of the cases of pulmonary TB, providing greater rate of treatment and reducing risk of disease transmission.

Key words: Pulmonary tuberculosis, PCR, diagnosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxas de incidência da TB no mundo, em 2013.....	21
Figura 2	Esquematização da STNPCR.....	31
Figura 3	Curva de amplificação da PCR em tempo real com suas três fases.....	32
Figura 4	Representação da sonda TaqMan®.....	32
Figura 5	PCR em tempo real com a sonda TaqMan.....	33
Figura 6	Esquematização dos pacientes e amostras inclusos na pesquisa.....	40
Figura 7	Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio com amostras de pacientes, sendo os poços 2, 10 e 11 pacientes positivos, o controle positivo de 316pb (poço 14) e o marcador de peso molecular de 100pb no poço 15.....	48
Figura 8	Gráfico de amplificação das amostras biológicas juntamente com a curva padrão (3×10^7 bacilos/ml a 3×10^1 bacilos/mL).....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais dos indivíduos analisados.....	46
Tabela 2	Desempenho da STNPCR em pacientes com suspeita de TB pulmonar, utilizando cultura como padrão ouro.....	49
Tabela 3	Desempenho da STNPCR em pacientes com suspeita de TB pulmonar, utilizando cultura e/ou o diagnóstico clínico e a resposta terapêutica como padrão ouro.....	51
Tabela 4	Desempenho da qPCR em pacientes com suspeita de TB pulmonar, utilizando cultura como padrão ouro.....	53
Tabela 5	Desempenho da qPCR em pacientes com suspeita de TB pulmonar, utilizando cultura e/ou o diagnóstico clínico e a resposta terapêutica como padrão ouro.....	54
Tabela 6	Desempenho da STNPCR em qualquer amostra de pacientes portadores do HIV.....	55
Tabela 7	Desempenho da qPCR em qualquer amostra de pacientes portadores do HIV.....	55
Tabela 8	Desempenho da baciloscopia em amostras de escarro em pacientes com suspeita de TB pulmonar.....	56
Tabela 9	Desempenho da cultura em amostras de urina em pacientes com suspeita de TB.....	57
Tabela 10	Desempenho da cultura em amostras de escarro em pacientes com suspeita de TB pulmonar.....	57
Tabela 11	Comparação dos desempenhos das técnicas diagnósticas da TB pulmonar, em porcentagem.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a. C	Antes de Cristo
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BK	Bacilo de Koch
CNCT	Campanha Nacional Contra a Tuberculose
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
C_t	<i>Cycle Threshold</i>
DCF	Dose Fixa Combinada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DOTS	Estratégia de Tratamento Diretamente Observado
E	Especificidade
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
G	Força Gravitacional
HC/UFPE	Hospital das Clínicas/Universidade Federal de Pernambuco
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HUOC	Hospital Oswaldo Cruz
IFN- γ	Interferon-gama
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
IS	Sequências de inserção
JL	Löwenstein-Jensen
k	Índice kappa
LCR	Líquido céfalo-raquidiano
MDR	Multidroga resistentes
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NAA	Técnicas de amplificação do ácido nucléico
NaOH	Hidróxido de Sódio
NPCR	Nested PCR

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PNB	Ácido para-nitrobenzóico
PPD	Proteína derivada purificada
qPCR	PCR em tempo real
S	Sensibilidade
SNT	Serviço Nacional de Tuberculose
STNPCR	<i>Single tube</i> Nested PCR ou Nested PCR em único tubo
SUS	Sistema Único de Saúde
TAAN	Teste de amplificação de ácidos nucleicos
TB	Tuberculose
TCH	Hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
ZN	Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	18
2.1 HISTÓRICO.....	18
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.3 AGENTE ETIOLÓGICO.....	21
2.4 TRANSMISSÃO E IMUNOPATOGENIA.....	23
2.5 CONTROLE, PREVENÇÃO E TRATAMENTO.....	24
2.6 DIAGNÓSTICO.....	26
2.6.1 Clínico.....	26
2.6.2 Diagnóstico por imagem e Prova tuberculínica.....	27
2.6.3 Diagnóstico Bacteriológico.....	28
2.6.4 Métodos moleculares.....	29
2.6.4.1 <i>Nested PCR e Nested PCR em Único tubo (STNPCR)</i>	30
2.6.4.2 <i>PCR em tempo real (qPCR)</i>	31
2.6.4.3 <i>Xpert® MTB/RIF</i>	33
3 JUSTIFICATIVA	36
4 OBJETIVOS	37
4.1 OBJETIVO GERAL.....	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	38
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	38
5.1.1 População e Local de Estudo.....	38
5.1.2 Informações do Estudo.....	38
5.1.3 Grupos de estudo.....	39
5.1.4 Padrão ouro.....	39
5.1.5 Critérios de inclusão.....	39
5.1.6 Critérios de exclusão.....	40
5.1.7 Considerações éticas.....	40
5.1.8 Cálculo amostral.....	41
5.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOTRAS BIOLÓGICAS.....	41

5.2.1 Sangue.....	41
5.2.2 Urina.....	41
5.2.3 Escarro.....	42
5.3 BACILOSCPIA.....	42
5.4 CULTURA E IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS EM MEIO LÖWENSTEIN-JENSEN.....	42
5.5 EXTRAÇÃO DO DNA.....	43
5.6 CONDIÇÕES DA NESTED PCR EM ÚNICO TUBO (STNPCR).....	43
5.7 ELETROFORESE.....	44
5.8 CONDIÇÕES DA PCR EM TEMPO REAL (qPCR).....	44
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
6 RESULTADOS.....	46
7 DISCUSSÃO.....	59
8 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	76
APÊNDICE B – Ficha clínica-epidemiológica.....	78
ANEXO A - Parecer de Aprovação do CEP-CPqAM/FIOCRUZ.....	84

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* que afeta tipicamente os pulmões, mas pode atingir qualquer órgão do corpo causando a tuberculose extrapulmonar. Essa patologia permanece como uma das infecções mais devastadoras e amplamente difundidas no mundo, sendo considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública. Em 2013, estimou-se que 9 milhões de pessoas desenvolveram tuberculose no mundo e 1,5 milhão dos pacientes foram a óbito. Foram estimados 480.000 novos casos multidrogas resistentes (MDR-TB), com aproximadamente 210.000 mortes, no mesmo ano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014).

No Brasil, a TB é uma das principais causas de morbimortalidade, ocupando o 16º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos no mundo. O país notificou 71.123 novos casos de TB em 2013, sendo que 85,7% apresentaram a forma clínica pulmonar e, destes, 65,2% eram bacilíferos. O estado de Pernambuco registrou, em 2012, 4.397 casos, sendo o 4º estado do Brasil com maior taxa de incidência (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2013; BRASIL, 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

O diagnóstico precoce e tratamento adequado são essenciais para a eficácia dos programas públicos de controle da doença, os quais buscam curar os doentes e evitar a transmissão da doença. O tratamento inadequado ou a não-aderência pelo paciente, quer seja por abandono ou efeitos adversos à medicação, são importantes fatores de risco para o desenvolvimento da resistência na tuberculose, além de que o tempo durante o qual a cadeia de transmissibilidade é mantida tem sido apontado como um dos principais fatores da perpetuação da doença (DUCATI et al., 2006; HUF; KRITSKI, 2012).

Os métodos diagnósticos confirmatórios envolvem a comprovação bacteriológica, ou seja, a identificação do bacilo através da baciloscopia ou cultura. A baciloscopia necessita de 5.000 a 10.000 bacilos/mL de amostra para que o resultado seja positivo, por isso, é capaz de detectar o bacilo em apenas 50 a 60% dos casos de TB pulmonar. Além disso, um exame micobacteriológico direto positivo não diferencia a espécie de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), nem permite distinguir bacilos vivos de bacilos mortos. A cultura, apesar de ter melhor sensibilidade, apresenta resultados demorados, que podem ser obtidos de 6 a 8 semanas (BENTO et al., 2011; GUERRA;

REGO; CONDE, 2008). Essas dificuldades para identificar a doença levam à necessidade de se buscar novos métodos diagnósticos mais rápidos, sensíveis e específicos. Nesse contexto, surgiram os testes de amplificação de ácidos nucleicos (TAAN), dos quais o mais comumente usado é a reação em cadeia da polimerase (PCR). A sensibilidade e a especificidade desses testes têm sido extensivamente estudadas e o uso de testes moleculares para o diagnóstico da tuberculose e da tuberculose multidroga resistente vem aumentando cada vez mais (BENTO et al., 2011; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

O conhecimento da biologia molecular aumentou nos últimos anos e permitiu o avanço e aplicação de técnicas como sequenciamento do ácido desoxirribonucleico (DNA), PCR e clonagem molecular. A PCR é a amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, visando a proliferação de milhões de cópias dessa sequência em um tubo de ensaio (FARAH, 2007; WU; CSAKO, 2006). Essa técnica é um método sensível para a detecção de DNA de micobactérias diretamente de espécimes clínicas (LIMA et al., 2009). A PCR em tempo real (qPCR) é uma técnica inovadora, capaz de promover a quantificação acurada e o monitoramento em tempo real do produto amplificado (LI et al., 2010; MIDVANI et al., 2009). É uma metodologia que permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases de uma reação de PCR. Durante a qPCR o acúmulo de *amplicons* é detectado em "tempo real", para cada ciclo da reação, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas sequência-específica ou *primers* usados na reação. As maiores vantagens da PCR em tempo real em relação à PCR convencional são a rapidez, maior precisão, reprodutibilidade e acurácia, além de um menor risco de contaminação (NOVAIS; ALVES-PIRES; SILVA, 2004).

A reamplificação de produtos de PCR com um segundo par de oligonucleotídeos que se ligam internamente ao local de anelamento do primeiro par, deu origem à Nested-PCR. A Nested-PCR em único tubo ou Single tube Nested-PCR (STNPCR) é uma variante da PCR que além mais rápida do que as técnicas de Nested-PCR convencionais, possui menor possibilidade de contaminação, pois as duas reações de PCR ocorrem seguidamente, ou seja, os produtos amplificados na primeira reação servem de molde para a segunda, sem haver abertura nem troca de tubos ou adição de novos reagentes (ABATH; WERKHÄUSER; MELO, 2002). As maiores vantagens da STNPCR em relação à PCR convencional são a rapidez, reprodutibilidade e um menor

risco de contaminação. Portanto, a STNPCR enquadra-se em um tipo de diagnóstico rápido, com possibilidade de maior sensibilidade e especificidade (LIMA, 2009).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho das duas técnicas moleculares, a STNPCR e a qPCR, na detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em diferentes amostras biológicas provenientes de pacientes com suspeita de TB pulmonar, comparando seus desempenhos com as metodologias convencionais (baciloscopia e cultura) e entre si.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 HISTÓRICO

A tuberculose humana (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, que surgiu há mais de 15000 anos. A TB foi responsável por milhões de mortes no passado, quando não havia tratamento para os pacientes infectados (CAMPOS, 2006; DUCATI et al., 2006). Apesar da cura da doença ter sido descoberta há mais de 50 anos, ela continua umas das doenças infecciosas mais mortais do mundo (ARNOLD, 2006).

A tuberculose pulmonar é conhecida desde o de tempo de Hipócrates como “tísica” (DUCATI et al., 2006). De épocas passadas, desde a Antiguidade, a maior informação sobre as vítimas de tuberculose é relativa às camadas sociais mais favorecidas economicamente, aos faraós e altos sacerdotes. Esqueletos com lesões ósseas compatíveis com a tuberculose têm sido encontrados em várias regiões, sendo o mais antigo de cerca de 5000 a.C. A primeira evidência mais segura de tuberculose constatou-se em 44 múmias bem preservadas, datando de 3700 a 1000 a.C. todas em Tebas. A primeira múmia plebeia com tuberculose foi identificada no Peru, com técnicas de biologia molecular, através da identificação da sequência de inserção IS6110. Estima-se que essa múmia tenha vivido a 1100 a.C. (ROSEMBERG, 1999).

A especulação da natureza infecciosa da TB foi realizada pelo médico inglês Benjamin Marten, em 1722. Em 1865, Jean-Antoine Villemin havia demonstrado formalmente que a TB era uma doença contagiosa, reproduzindo seus experimentos em coelhos, entretanto seus achados foram ignorados por muito tempo (DUCATI et al., 2006). O bacilo causador da doença foi isolado por Robert Koch, bacteriologista alemão em 1882, sendo, por isso, também chamado de bacilo de Koch (BK), em sua homenagem. Em 1890, Koch introduziu a tuberculina, uma solução contendo produtos do bacilo, como uma possível ferramenta para cura da tuberculose, provocando uma revolução mundial. Entretanto ela viria a ser usada como um indicador de exposição prévia ao bacilo (hoje conhecido como teste tuberculínico ou teste de Mantoux). O manejo efetivo da doença não foi alcançado até que os antibióticos se tornassem disponíveis, cerca de 70 anos depois (CAMPOS, 2006; ROSEMBERG, 1999; SHAMPO; ROSENOW, 2009).

Nos últimos séculos tem se conhecido melhor as repercussões da tuberculose nas classes sociais mais altas. Em contraposição, das multidões populares que sofreram com a tuberculose, em condições muitas vezes abaixo da dignidade humana, quase nada foi descrito. Entre o final do século 18 e início do 19, aconteceu a revolução industrial na Inglaterra, estendendo-se pela Europa, onde multidões operárias concentraram-se nos maiores centros urbanos. Em meados do século 19, ocorreram em Paris grandes reformas urbanas: um grande número de trabalhadores pobres concentraram-se na periferia nas piores condições imagináveis, em cortiços improvisados, para mais de 100 pessoas. Nessa situação, os óbitos por tuberculose atingiam a 80% da mortalidade geral. Além disso, em toda a história das conquistas territoriais, das colonizações, onde o homem civilizado esteve presente, esteve também o bacilo da tuberculose (ROSEMBERG, 1999).

A tuberculose foi introduzida no Brasil pelos portugueses e missionários jesuítas, a partir do seu descobrimento, no ano de 1500. Com a Reforma Carlos Chagas, no final da década de 10, criou-se a Inspetoria de Profilaxia da Tuberculose que preconizava o diagnóstico e tratamento dos casos de TB. Em 1927, Arlindo de Assis aplica pela primeira vez a vacina Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) oral em recém-nascidos. Já em 1941, foi criado o Serviço Nacional de Tuberculose (SNT) com a função de analisar os problemas relativos a tuberculose e ao desenvolvimento de meios de ação profilática e assistencial. E 5 anos depois, instalou-se a Campanha Nacional Contra a Tuberculose (CNCT). A partir da década de 40, inicia uma mudança significativa na tendência da mortalidade por TB em decorrência da utilização dos tuberculostáticos, enquanto na década de 60, começa efetivamente a utilização de esquemas terapêuticos padronizados (RUFFINO-NETTO, 2002).

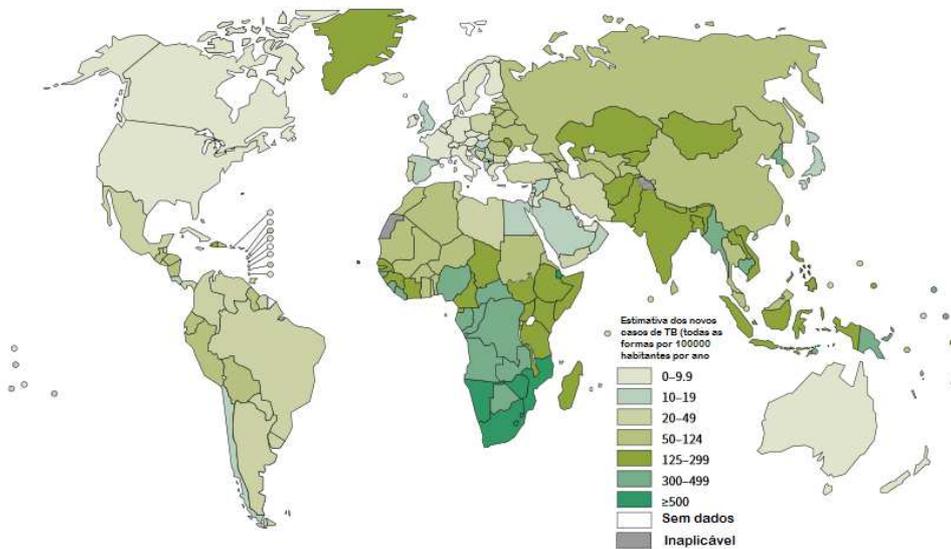
Nos anos 80, com a disseminação da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a deterioração dos programas de controle da TB, a doença retorna como importante questão de saúde pública nos países desenvolvidos da América do Norte e Europa (BOLLELA et al., 1999). Além disso, outros importantes fatores que contribuíram para o ressurgimento da doença foram os surtos de tuberculose multirresistente (MDR) e o fato de ser uma doença negligenciada em muitos lugares (HIJJAR et al., 2005). Desde abril de 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a tuberculose uma emergência global incentivando medidas de controle da doença em todo o mundo. Nesses mais de 20 anos desde a declaração da OMS considerando a TB como emergência global de saúde pública as taxas de mortalidade e

incidência vêm decaindo (BOLLELA et al., 1999; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A diminuição progressiva da incidência de tuberculose durante as primeiras oito décadas do século passado alcançou subitamente seu maior nível no início da década de 1980. Quando a OMS decretou a TB em estado de emergência mundial, em 1993, estava fundamentada pelos altos índices de incidência e mortalidade existentes, principalmente em países com piores condições socioeconômicas. A epidemia pelo HIV favoreceu o aumento de novos casos de TB, causando impacto no controle da doença e aumentando a frequência das formas graves, extrapulmonares e disseminadas (HIJJAR et al., 2005; WILDNER et al., 2011).

Em 2013, foram estimados 9 milhões de novos casos de tuberculose no mundo, sendo mais da metade dos casos (56%) provenientes da Ásia Sul-Oriental e do Pacífico Ocidental, como pode-se observar na Figura 1. Das 1,5 milhões de mortes relatadas, aproximadamente 1,1 milhões foi em pacientes HIV negativos e 400000 mortes em pacientes HIV/TB. Cerca de 1,1 milhão dos que desenvolveram TB em 2013 eram HIV-positivos (13%). Foram estimados 480.000 novos casos multidrogas resistentes (MDR-TB), com aproximadamente 210.000 mortes por resistência. Das pessoas que foram diagnosticadas com TB pela primeira vez (novos casos), 2,5 milhões tinham TB pulmonar e baciloscopia positiva, 1,9 milhão TB pulmonar e baciloscopia negativa e 0,8 milhão TB extrapulmonar. O restante dos novos casos não realizaram baciloscopia ou o tipo de TB foi desconhecido (KONEMAN et al., 2001; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014).

Figura 1 – Taxas de incidência da TB no mundo, em 2013.

Fonte: Organização Mundial De Saúde (2014).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2013, o Brasil notificou 76.020 casos novos e de reinfecção de TB, sendo 65405 da forma pulmonar da doença, com 70% de confirmação bacteriológica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014). No ano de 2012, o país apresentou uma taxa de incidência de 35,4 casos por 100.000 habitantes e de mortalidade de 2,3 por 100.000 habitantes. Nesse mesmo ano, os estados do Amazonas, Rio de Janeiro e Mato Grosso apresentaram as maiores taxas de incidência do país (70,6; 61,7 e 50,6 por 100.000 habitantes, respectivamente). Já Pernambuco notificou 4.397 novos casos, em 2012, ocupando o quarto lugar em incidência, com taxa de 49,3 por 100.000 habitantes. Neste mesmo ano, Pernambuco registrou a segunda maior taxa de mortalidade do país, com 4,2 óbitos para cada 100 mil habitantes. A capital do estado, Recife, registrou, também em 2012, 1.493 casos (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2013; PERNAMBUCO, 2013).

2.3 AGENTE ETIOLÓGICO

As micobactérias são microrganismos que apresentam forma bacilar com dimensões que variam de 0,2µm a 0,6µm de largura e 1µm a 10µm de comprimento. São bacilos delgados, retos ou ligeiramente curvos, pleomórficos, aeróbios ou

microaerófilos, imóveis e incapazes de formar esporos, conídeos ou cápsulas. O tempo de multiplicação é geralmente lento e apresenta grande variação dentro do gênero, o que permite dividi-las em micobactérias de crescimento rápido e lento. Elas pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família Mycobacteriaceae, sub-ordem Corynebacteriaceae, ordem Actinomycetales. O complexo *Mycobacterium tuberculosis*, é composto pelo *M. tuberculosis*, que causa a TB humana, *M. bovis*, *M. bovis-Bacille Calmett-Guérin (BCG)*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e *M. canettii* (CAMPOS, 2006; WILDNER et al., 2011).

O *Mycobacterium tuberculosis* é o bacilo humano propriamente dito pois é responsável por 98% dos casos de tuberculose. É um patógeno intracelular aeróbico estrito que necessita de oxigênio para crescer e se multiplicar. Por ser capaz de sobreviver e de se multiplicar no interior de células fagocitárias, é considerado um parasito intracelular facultativo, de virulência variável. Dentre as suas principais propriedades biológicas destaca-se a capacidade de produzir niacina, por ser a única micobactéria que a sintetiza. O teste da nitrato-redutase é positivo e tem atividade catalásica inativando-se a 68°C. Os estudos sobre seu genoma, composto por, aproximadamente, 4.000 genes, vêm trazendo luz para fatos importantes de sua patogenicidade. Cerca de 170 genes codificam famílias de proteínas envolvidas em sua variação antigênica, enquanto aproximadamente 200 outros genes codificam enzimas para o metabolismo de ácidos graxos. É possível que essa especialização genética esteja relacionada com a capacidade de o BK crescer nos tecidos do hospedeiro, onde os ácidos graxos podem ser a principal fonte de carbono. Alguns dos genes identificados vêm sendo relacionados com determinadas características da parede do bacilo e parecem ser importantes no controle da latência e da virulência do bacilo, através da modulação de mecanismos que interferem na ação do macrófago sobre ele. Outros genes identificados seriam responsáveis pelo metabolismo da bactéria e pela codificação de proteínas, lipídeos e carboidratos em sua parede, modulando, assim, sua virulência (CAMPOS, 2006; TARANTINO, 2008).

Elementos transponíveis, ou móveis, são comuns nos genomas de todas as plantas e animais, assim como de bactérias, onde são conhecidos como sequências de inserção (IS). Essas sequências tem a habilidade de integrar ao genoma num novo sítio por um mecanismo de “cortar e colar”, onde o elemento é geralmente cortado de um sítio e inserido em uma nova localização no cromossomo. Os elementos transponíveis são as causas mais comuns de novas mutações, em diversos organismos. Vários

elementos repetitivos de DNA que contribuem para a variação genética de cepas foram descobertas em *M. tuberculosis*. Um deles é justamente a sequência de inserção IS6110, que contém 1350 pares de bases e está exclusivamente nas espécies do complexo *M. tuberculosis*. Estima-se que existam mais de 25 cópias da sequência de inserção IS6110 por genoma do *M. tuberculosis* (ASSIS, et al., 2007; ARNOLD, 2006; WATSON et al., 2006). A exclusividade da presença da sequência IS6110 em espécies do complexo *M. tuberculosis*, além da repetição da referida sequência em seu genoma, tem tornado esse alvo o mais imensamente estudado e uma ferramenta importante no diagnóstico e diferenciação de espécies e em estudos epidemiológicos (BROCCOLO et al., 2003; COROS; DECONNO; DERBYSHIRE, 2008; HELLYER et al., 1996).

2.4 TRANSMISSÃO E IMUNOPATOGENIA

A via de transmissão da tuberculose é, quase sempre, inalatória. Um indivíduo doente, portador de lesão pulmonar, pode, ao tossir ou ao falar, eliminar uma carga bacilar, no ambiente. As partículas contendo os bacilos (gotículas de Flügge), ao serem expostas ao vento e aos raios solares, são ressecadas ou sofrem evaporação e passam a ter volume ainda menor (núcleos de Wells – ou núcleos infecciosos; com diâmetros de 2 a 10 micra de diâmetro e com 1 a 2 bacilos em suspensão), passíveis de serem inaladas e atingirem o pulmão das pessoas naquele ambiente. Vários fatores ambientais reduzem as probabilidades das partículas infectantes serem inaladas: as correntes de ar dispersando as partículas no ambiente, a luz ultravioleta (sol) e a radiação gama que pode destruir os bacilos. Caso a inalação aconteça, esses indivíduos passam a ser chamados de infectados (CAMPOS, 2006; WILDNER, 2011).

Quando o *M. tuberculosis* penetra pela primeira vez no organismo, se a carga bacilar não for elevada, ele pode ser assintomático, e o único testemunho da infecção é a viragem no teste tuberculínico (TARANTINO, 2008). De um modo geral, estima-se que 10% dos infectados adoecerão (CAMPOS, 2006). A primoinfecção ocorre com mais frequência na infância, onde algumas crianças exteriorizam alguns sintomas inespecíficos e passageiros. Porém, se a carga bacilar for mais intensa, é comum uma sintomatologia mais acentuada. Após a inalação, as gotículas são levadas até a árvore brônquica e atingem os alvéolos, onde os bacilos iniciarão o processo patológico da doença, caso consigam ultrapassar os mecanismos de defesa inespecíficos do indivíduo e multiplicar-se dentro do macrófago alveolar. Há uma resposta inicial inespecífica da

qual participam neutrófilos, macrófagos e linfócitos, constituindo o foco inicial ou primário da infecção. Quando o bacilo chega no pulmão, ultrapassando as barreiras primárias de defesa do organismo, pode surgir um foco pulmonar, conhecido como nódulo de Gohn (complexo primário). O complexo primário pode ter evolução abortiva e passar totalmente despercebido ou então, a partir dele, pode haver uma disseminação linfática até o gânglio satélite (foco ganglionar), de onde poderá haver disseminação hematogênica para todo organismo, podendo resultar em TB disseminada ou em formas pulmonares e extrapulmonares da doença. Isso ocorre frequentemente na reinfecção, ou tuberculose pós-primária, que usualmente vem a ocorrer no adulto muitas vezes devido a uma baixa na imunidade (CAMPOS, 2006; CAPONE et al., 2006; WILDNER, 2011).

No processo imunitário antituberculoso há um ciclo principal interdependente de macrófagos e linfócitos T, os mais atuantes são $CD4^+$ e $CD8^+$. No grupo de citocinas que potencializam as defesas do hospedeiro, pode-se citar o fator de necrose tumoral-alfa ($TNF-\alpha$) e o interferon-gama ($IFN-\gamma$) (TARANTINO, 2008). Essas citocinas desempenham papel importante ao inibir a maturação da formação do fagossoma pela micobactéria, além de estimular mecanismos microbicidas, como a produção de intermediários de oxigênio reativo e nitrogênio. Os intermediários de nitrogênio já tiveram papel protetor demonstrado em modelos de camundongo, enquanto os produtos de oxigênio ainda não foram completamente explicados, apesar de saber-se que o peróxido de hidrogênio produzido por macrófagos ativados por citocinas tem atividade microbicida. A atividade principal do linfócito T $CD4^+$ é produzir citocinas, incluindo $IFN-\gamma$, que ativa os macrófagos e promove a destruição do bacilo. Os linfócitos T $CD8^+$ são capazes de secretar $IFN-\gamma$, além de lisar células infectadas e reduzir o número de bactérias intracelulares (PALOMINO; LEÃO; RITACCO, 2007).

2.5 CONTROLE, PREVENÇÃO E TRATAMENTO

A sigla BCG deriva do nome inicial Bacilo de Calmette-Guérin. A BCG é atualmente a vacina mais utilizada no mundo contra a TB. Já foi administrada em cerca de 2 a 3 bilhões de pessoas, desde 1948, sem sérias complicações, é fácil de aplicar, também pode ser administrada como uma vacina oral, só necessita uma dose e confere imunização por um longo período, além de ter um baixo custo de produção. A vacina provoca o desencadeamento do processo imunitário, conferindo resistência em graus variáveis no ser humano e nos animais. É derivada do bacilo tuberculoso bovino que foi

cultivado em meio de batata glicerizada com bile de boi, durante 13 anos, com 230 repicagens quinzenais. Esse bacilo sofreu um mutacionismo tornando-se avirulento, mantendo-se as propriedades imunogênicas (DUCATI et al, 2006; TARANTINO, 2008).

O objetivo do controle da tuberculose é, principalmente, reduzir as fontes de infecção, identificando os casos, e submetendo-os ao tratamento adequado precocemente, levando à consequente redução da incidência, prevalência e mortalidade específicas pela tuberculose. O país tem normas técnicas padronizadas e garante, através do Sistema Único de Saúde, acesso gratuito ao diagnóstico, ao tratamento e à prevenção. A principal estratégia do modelo de atenção ao paciente com tuberculose, denominada DOTS (Estratégia de Tratamento Diretamente Observado), é fator essencial para se promover o efetivo controle da doença, e tem sido adotada a nível mundial. A estratégia DOTS tem como elemento central o tratamento supervisionado e visa o aumento da adesão dos pacientes, a ampliação da identificação das fontes de infecção (pacientes pulmonares bacilíferos) e o aumento da cura, reduzindo-se, assim, o risco de transmissão da doença na comunidade (BRATS, 2011; HIJJAR et al., 2005). Ainda no contexto de controlar a tuberculose, foi criada a estratégia *Stop TB* que tem como meta reduzir drasticamente a mortalidade global da TB até 2015, através de vários objetivos, sendo um desses a implementação mundial da DOTS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). Com a chegada de 2015, analisou-se a queda de 45% na taxa de mortalidade e 41% na taxa de incidência, no período de 1990 a 2013. Sabe-se que os planos devem ser acelerados para que se atinja a meta de reduzir em 50% as taxas até o fim de 2015. Os novos planos também incluem uma redução de 95% a taxa de mortalidade, além de 90% a taxa de incidência até 2035 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014).

A tuberculose é uma doença grave, porém curável. Caso o esquema medicamentoso for adequado, se as doses corretas forem tomadas regularmente pelo tempo suficiente, praticamente 100% dos doentes poderão ser curados. No Brasil, os esquemas terapêuticos são padronizados. O Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) é responsável pelas normas de prevenção, diagnóstico e tratamento e pela distribuição dos medicamentos, que são distribuídos gratuitamente. O objetivo principal da quimioterapia nos pacientes com TB é a erradicação da carga bacilar total (CAMPOS, 2007; DUCATI et al., 2006).

A descoberta da potente quimioterapia ocorreu no início da década de 60. São regimes de tratamentos diário ou intermitente, por longos períodos, que podem variar de 6 meses a 1 ano ou mais. Nos países em desenvolvimento como o Brasil, a problemática do tratamento da TB está na alta taxa de abandono que, em algumas capitais, pode atingir, em média, 25% dos pacientes tratados. A importância desse tema centra-se no fato de que, o portador de TB pulmonar que não adere à terapêutica, continua doente, e permanece como fonte de contágio. Além disso, a irregularidade do tratamento leva à resistência e à recidiva da doença, dificultando o processo de cura e aumentando o tempo e o custo do tratamento. Em 2010, foi implementado um novo esquema de tratamento, chamado DFC (Dose Fixa Combinada), que combina os quatro principais fármacos antituberculosos (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) em um único comprimido. O uso desta medicação está preconizado para os primeiros 60 dias de terapia; o restante do tratamento (quatro meses) é feito com rifampicina e isoniazida, também em um único comprimido. Esse tratamento reduz a quantidade de doses diárias, o que deve aumentar a adesão dos pacientes ao tratamento e elevar os índices de cura (MENDES; FENSTERSEIFER, 2004; WILDNER et al., 2011).

2.6 DIAGNÓSTICO

2.6.1 Clínico

Diagnosticar um doente tuberculoso particularmente um bacilífero (doente que, ao tossir, ou falar, pode eliminar bacilos no ambiente), e trata-lo corretamente, curando-o, é eliminar uma fonte de infecção (CAMPOS, 2006). Isso é interromper a cadeia de transmissão entre seus familiares e contactantes. Alguns pacientes com TB pulmonar não demonstram nenhum indício da doença, outros apresentam sintomas inespecíficos aparentemente simples que são ignorados durante alguns meses ou anos. Contudo, a maior parte dos doentes tuberculosos tem lesão no pulmão que causa tosse e os sintomas mais característicos. Os sinais e sintomas mais frequentes são tosse seca e contínua no início e, em seguida, com a presença de secreção, por mais de três semanas, a qual se transforma, na maioria das vezes, em uma tosse produtiva purulenta ou com focos de sangue (hemoptise); astenia; febre baixa, geralmente vespertina; sudorese noturna; inapetência; palidez; emagrecimento acentuado; rouquidão e prostração. Nos casos graves, os pacientes podem apresentar dispneia; hemoptise maciça; colapso do

pulmão e empiema pleural, se houver comprometimento dessa membrana, e pode ocorrer ainda dor torácica (WILDNER et al., 2011). Mas nem sempre os sintomas se apresentam dessa forma, e em determinados grupos a sua identificação pode ser difícil, como em crianças e idosos. Nos idosos são difíceis de identificar pela coexistência com outras doenças respiratórias e pela inespecificidade, enquanto que nas crianças os sintomas também são bastante inespecíficos, o que dificulta a suspeita clínica e retarda o diagnóstico da doença (CANTALICE FILHO; SANT'ANNA; BÓIA, 2007; MACIEL et al., 2008).

2.6.2 Diagnóstico por imagem e Prova tuberculínica

A tuberculose pulmonar cursa quase sempre com alterações na radiografia de tórax. Esse exame constitui, em muitas ocasiões, a primeira abordagem diagnóstica, não apenas por seu baixo custo e facilidade de realização, mas, sobretudo, pelas inúmeras informações que proporciona quando criteriosamente avaliada. De forma geral, as alterações radiológicas da tuberculose representam a tradução dos eventos patogênicos a partir do contágio. Na radiografia de tórax, a tuberculose pulmonar ativa pode manifestar-se sob a forma de consolidações, cavitações, padrões intersticiais (reticulares/retículo-nodulares), linfonomegalias hilares ou mediastinais e derrame pleural (BENTO et al., 2011; CAPONE et al., 2006; BOMBARDA et al., 2001). Por outro lado, é geralmente difícil determinar apenas pela radiografia o grau de atividade da doença (antiga *versus* recente). Imagens com densidade cicatricial e mesmo com granuloma calcificado podem estar presentes na TB ativa. Além disso, a radiografia pode apresentar imagens inespecíficas, principalmente em crianças e pacientes imunodeprimidos. Além disso alterações radiológicas podem ocorrer devido à infecções por outras espécies de micobactérias (BENTO et al., 2011; MORRONE et al., 2003; NATAL, 2000).

O teste cutâneo da tuberculina com preparação padrão de derivado proteico purificado (PPD) utilizado desde 1930 para determinar a presença de infecção pelo *M. tuberculosis* contém uma mistura de antígenos que induz a uma reação de hipersensibilidade tardia, mediada por linfócitos T. O tamanho da reação ao PPD é usado para classificar os indivíduos de acordo com a probabilidade de ter ou não a infecção (MARQUES et al., 2007). No Brasil, a tuberculina usada é o PPD RT23. Ela é injetada rigorosamente na derme, no terço médio da face anterior do antebraço

esquerdo, usando-se portanto a técnica intradérmica idealizada há anos por Mantoux. A quantidade de líquido deverá ser sempre de 0,1 mL, equivalente a 2UT (unidades de tuberculina). Quando a técnica é realizada de forma correta, forma-se pápula isquemiada no local. A leitura é efetuada entre 48 a 72 horas. Sendo a reação positiva, surge endureção que deve ser medida com régua milimetrada na posição perpendicular ao braço. A técnica de aplicação e o material utilizado são padronizados pela OMS e têm especificações semelhantes às usadas para a vacinação BCG. Quando conservada em temperatura entre 4°C e 8°C, a tuberculina mantém-se ativa por seis meses. Não deve, entretanto, ser congelada nem exposta à luz solar direta. (BRASIL, 2002; TARANTINO, 2008).

2.6.3 Diagnóstico Bacteriológico

Embora o diagnóstico presuntivo da TB possa ser feito através de dados da história clínica, epidemiológica e achados radiológicos, o diagnóstico definitivo ainda depende do encontro do bacilo através da baciloscopia e cultura (BOLLELA; SATO; FONSECA, 1999). O diagnóstico definitivo requer o isolamento do agente etiológico e o exame padrão-ouro continua sendo a cultura (BENTO et al., 2011).

De acordo com o Ministério da saúde, a identificação de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) na amostra respiratória através do exame direto, ou baciloscopia, é considerada evidência suficiente para que se inicie o tratamento anti-TB. A baciloscopia é um exame rápido, de fácil execução e de baixo custo. Pode ser realizado por diferentes métodos. A técnica de Ziehl-Neelsen (ZN), uma das mais utilizadas, baseia-se na coloração pela fucsina básica que confere aos BAAR uma cor avermelhada após lavagem por álcool-ácido. Baseia-se nas características da parede celular das micobactérias, com elevado teor em lipídeos, o que lhes confere essa resistência (BENTO et al., 2011; GUERRA; REGO; CONDE, 2008). No entanto, a baciloscopia é capaz de detectar apenas de 50 a 60% dos casos de TB pulmonar, além de não diferenciar as espécies do BAAR. Em 2012, apenas 57% dos 4,6 milhões de novos casos notificados de TB pulmonar no mundo foram confirmados bacteriologicamente pelos métodos recomendados pela Organização Mundial de Saúde (BENTO 2011; GUERRA; REGO; CONDE, 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

O exame direto precisa de 5 a 10 mil bacilos por ml de amostra para ser positivo. Por isso, a cultura continua a se fundamental já que basta a presença de 10 bacilos por

ml de amostra para se obter um exame de cultura positivo, sendo assim, uma técnica mais sensível que o exame microscópico direto. Além de identificar a espécie da micobactéria, permite, também, testar sua sensibilidade aos quimioterápicos, mas requer maior sofisticação laboratorial que a baciloscopia e, pelo menos, 40 dias para a obtenção do resultado (BENTO et al., 2011; CAMPOS, 2006). O meio Löwenstein-Jensen (LJ) é o mais comumente utilizado na maioria dos laboratórios clínicos. O emprego de meios de cultura líquidos, seguido de sonda de DNA, com frequência estabelece identificação do microrganismo antes que o crescimento se torne visível no LJ. Entretanto, os estudos cromogênicos e as provas bioquímicas são mais exatos quando realizados a partir de subcultivos provenientes do meio LJ. Crescem colônias rugosas, amarelo-pálidas, se mantidas em estufa a 37°C. Outros meios sólidos usados são os de Middlebrook 7H10 e 7H11, cuja base é de ágar. Usam-se também os meios líquidos e o mais empregado é o meio comercial 7H9. Com a utilização desses meios recomenda-se a incubação numa atmosfera com 5 a 10 % de CO₂. A cultura é um exame muito criterioso, que deve ser analisado semanalmente com muita cautela, e onde ainda pode haver chances de resultados falso-positivos (KONEMAN et al., 2001; PALOMINO; LEÃO; RITACCO, 2007; TARANTINO, 2008).

2.6.4 Métodos moleculares

As técnicas laboratoriais convencionais (baciloscopia e cultura) estão longe de serem consideradas sensíveis e específicas ou adequadas para uma identificação rápida do *M. tuberculosis*. O desenvolvimento de técnicas de amplificação do ácido nucléico (TAAN) representou um avanço nas pesquisas relacionadas ao diagnóstico de várias doenças, incluindo o da tuberculose. Métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos para a identificação das micobactérias. De modo geral, esses métodos oferecem diversas vantagens, quando comparados aos convencionais: maior velocidade na obtenção dos resultados, reprodutibilidade e possibilidade de melhorar o manejo do doente (BROCCOLO et al., 2003; CAMPOS, 2006).

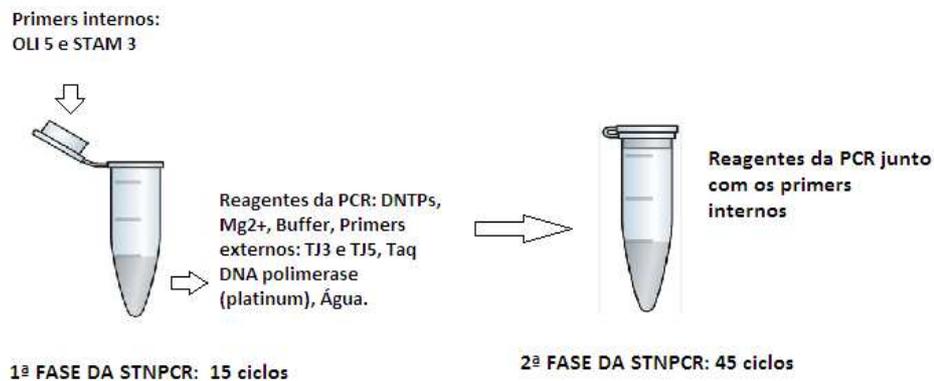
Testes moleculares baseados na amplificação de fragmentos de sequências genômicas do *M. tuberculosis* têm se mostrado uma importante ferramenta, capaz de detectar o bacilo em amostras biológicas. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada um método rápido e sensível, capaz de detectar menos de 10 bacilos por mL em diferentes espécimes clínicos, como sangue e urina (CRUZ et al., 2011; LIMA

et al., 2009). É um método eficaz para amplificação de segmentos específicos de DNA. A PCR utiliza a enzima DNA-polimerase, responsável pela síntese de DNA a partir de substratos de desoxinucleotídeos sobre um molde de DNA de fita simples. Dois oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) são sintetizados para que a reação ocorra (WATSON et al., 2006). Variantes na PCR convencional, como a Nested PCR (NPCR) e a PCR em tempo real (qPCR), vêm sendo desenvolvidas e avaliadas no sentido de melhorar o desempenho da técnica promovendo maior sensibilidade na detecção do alvo analisado (LIMA, 2009; CRUZ et al., 2011; LIRA et al., 2012; MONTENEGRO et al., 2013; SANTOS, 2012).

2.6.4.1 *Nested PCR e Nested PCR Em Único Tubo (STNPCR)*

Modificações na PCR convencional, como a adição de uma segunda reação (Nested PCR), têm aumentado sua sensibilidade e especificidade. Isso se deve ao fato que, com a NPCR, há diluição de potenciais inibidores da PCR, que comumente estão presentes em amostras biológicas. A NPCR utiliza dois conjuntos de primers em reações subsequentes, cujo produto de amplificação da primeira reação é utilizado como molde para a segunda. Nesse contexto, essa técnica é uma ferramenta molecular que pode auxiliar no diagnóstico mais rápido da doença, inclusive em casos difíceis de serem elucidados pelas técnicas convencionais, diminuindo a morbidade e melhorando o controle da tuberculose. Essa técnica tem sido uma das técnicas moleculares destacadas como promissoras para esse diagnóstico rápido da tuberculose (ASSIS, et al., 2007, FURINI et al., 2013; LIMA et al., 2009).

Outro tipo de sistema de PCR, criado a partir da NPCR, é a Nested PCR em único tubo (STNPCR). O objetivo proposto ao desenvolver STNPCR foi evitar a contaminação. A STNPCR minimiza os riscos de contaminação cruzada por não haver abertura dos tubos entre as duas etapas de PCR, como se observa na Figura 2 (JOU et al., 1997; LIMA, 2009). A STNPCR com os primers da segunda reação fixados na tampa do tubo foi proposta por Abath et al. (2002), enquanto essa reação para detecção do *M. tuberculosis* foi padronizada por Lima (2009).

Figura 2 – Esquemática da Nested PCR em único tubo (STNPCR).

Fonte: elaborado autora.

Legendas:

- dNTPs: desoxirribonucleotídeos fosfatados

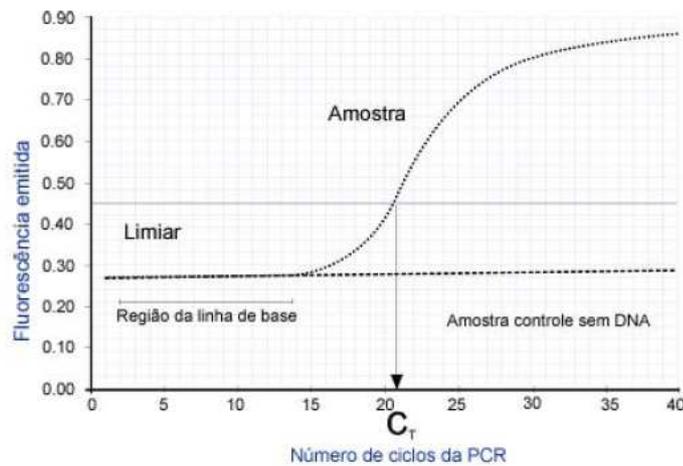
- Mg²⁺: magnésio

2.6.4.2 PCR em tempo real (qPCR)

A criação da PCR em tempo real (qPCR) trouxe inúmeras vantagens ao diagnóstico molecular. A qPCR permite a detecção, ciclo a ciclo, com elevada sensibilidade e especificidade da intensidade de fluorescência emitida em decorrência da amplificação da sequência de DNA-alvo. A emissão do sinal de fluorescência depende da ligação de uma sonda ao produto de DNA da reação ou é gerada por um fluoróforo sintetizado nas sequências dos *primers* (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010; WANG; SEED, 2003). A qPCR permite uma quantificação precisa de um ácido nucléico específico numa mistura complexa, mesmo que em um material com baixa concentração de DNA ou RNA. Teoricamente, a amostra de DNA na reação deve dobrar a cada ciclo, resultando numa amplificação exponencial do quantidade inicial de DNA. A reação pode ser dividida em três fases: exponencial, linear e plateau. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (C_t), que pode-se ver na Figura 3. Esse ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência. Os fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico. Os sistemas de detecção da qPCR utilizam estas moléculas que permitem o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. Como exemplos dessas moléculas tem-se: SYBR®Green, TaqMan®e Molecular beacons (Figura 4 e 5) (FRAGA; MEULIA;

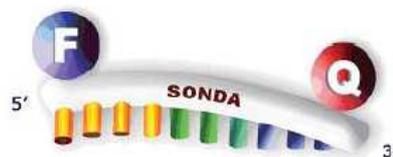
FENSTER, 2008; NOVAIS; ALVES-PIRES; SILVA, 2004). O desenvolvimento de técnicas moleculares para o diagnóstico e também para monitoramento clínico do *Mycobacterium tuberculosis* tem ganhado bastante atenção, principalmente a utilização da técnica de qPCR (BROCCOLO et al., 2003; MDIVANI et al., 2009; LI et al., 2010; LIRA et al., 2012)

Figura 3 – Curva de amplificação da PCR em tempo real com suas três fases.



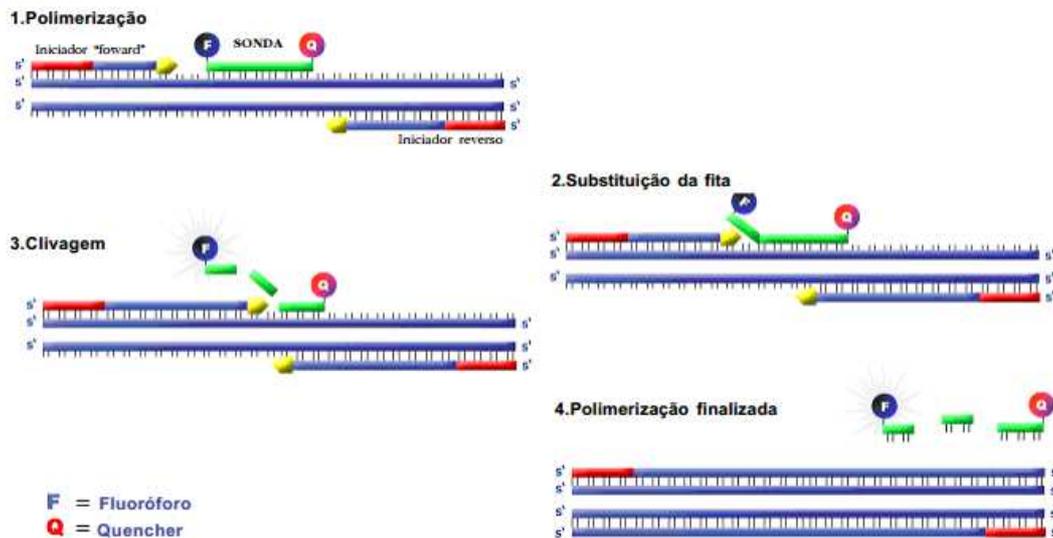
Fonte: Novais, Pires-Alves e Silva (2004).

Figura 4 – Representação da sonda TaqMan®.



Fonte: Novais, Pires-Alves e Silva (2004).

Nota: F – Fluoróforo e Q – *Quencher*.

Figura 5 – PCR em tempo real com a sonda TaqMan.

Fonte: Novais, Pires-Alves e Silva (2004).

2.6.4.3 Xpert® MTB/RIF

Uma nova opção laboratorial, o teste Xpert® MTB/RIF, foi lançado em 2004 por uma colaboração entre a empresa americana Cepheid Inc., a Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND), a Universidade de Medicina e Odontologia de Nova Jersey (UMDNJ), e o National Institutes of Health (NIH). O teste consiste na purificação, concentração e amplificação de ácidos nucleicos por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, e tem como principal benefício apresentado a integração e automatização dos três processos (preparação de amostras, amplificação e detecção). É utilizado para detecção do complexo *M. tuberculosis* e para a triagem de tuberculose resistente a fármacos (rifampicina) (BRATS, 2011; PIATEKA et al 2013; WEYER et al, 2013).

O teste utiliza um cartucho contendo todos os elementos necessários para a reação, incluindo reagentes liofilizados, tampões líquidos e soluções de lavagem. O princípio do teste baseia-se na amplificação, por meio de PCR, de cinco sondas sobrepostas que são complementares à região determinante da resistência à rifampicina, composta por 81 pares de bases do gene *rpoB* de *M. tuberculosis*. O processo de

amplificação por PCR, neste teste, é *heminested* e o alvo amplificado é detectado em tempo real por fluorescência (BRATS, 2011; FOUNDATION FOR INNOVATIVE NEW DIAGNOSTICS, 2011; PIATEKA et al 2013).

A maior parte dos estudos que avaliam o GeneXpert® revela elevadas sensibilidades e especificidades, em pacientes com cultura e baciloscopia positivas. Já nos casos com baciloscopia negativa, ou em amostras extrapulmonares, observa-se uma queda nesses índices, principalmente no que se refere à sensibilidade. Dentre as desvantagens do teste estão a necessidade de uma fonte de energia elétrica estável e ininterrupta e um computador acoplado para a análise dos dados. O instrumento necessita de, pelo menos, uma calibração anual que, atualmente, precisa ser realizada por um técnico treinado, munido de um equipamento de calibração especializado. O dispositivo mais comumente utilizado, o GeneXpert (GX4), tem uma produção limitada, sendo que a utilização de plataformas maiores encarece o teste. Os custos do equipamento e manutenção são uma barreira para a implantação do Xpert® em vários países (BRATS, 2011; FOUNDATION FOR INNOVATIVE NEW DIAGNOSTICS, 2011; HILLEMANN et al., 2011; PIATEKA et al 2013; ZEKA; TASBAKAN; CAVUSOGLU, 2011).

Os dados de custo da baciloscopia e da cultura confirmatória, obtidos da Tabela do SUS, são R\$4,20 e R\$5,63, respectivamente. Com relação aos dados de custo do Xpert® MTB/RIF, tem-se um preço mínimo encontrado de R\$27,04 negociado pela *Foundation for Innovative New Diagnostics* (FOUNDATION FOR INNOVATIVE NEW DIAGNOSTICS, 2011). Dentre os custos de implantação, os principais estão relacionados à aquisição da máquina (R\$27.268,0025, com o computador *desktop* ou R\$28.070,0025 com *notebook*) e ao treinamento de pessoal. Dentre os custos de manutenção, destaca-se a aquisição dos cartuchos, e os custos de logística para o transporte dos cartuchos até as máquinas (BRATS, 2011).

No Brasil os aparelhos GeneXpert® se tornaram disponíveis na rede pública de saúde em 2014, nos Estados de Amazonas, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, além do Distrito Federal, após um investimento de 12,6 milhões de reais (BRASIL..., 2014; TESTE..., 2013). Levando-se em consideração o cenário da saúde no Brasil, não se sabe se o atual Ministro da Saúde, Arthur Chioro, manterá a distribuição dos cartuchos necessários para a realização do teste. A possibilidade de implantação de uma tecnologia nacional, com custos menos elevados, faz com que busquemos uma

técnica capaz de suprir as necessidades da rotina laboratorial, no auxílio do diagnóstico de TB.

3 JUSTIFICATIVA

O Plano Nacional de Combate à Tuberculose e a portaria nº 1474/GM de 19 de agosto de 2002 enfatizam que o controle da doença compreende necessariamente o diagnóstico precoce. A perspectiva de um diagnóstico mais rápido, preciso e específico através de ferramentas moleculares têm se mostrado promissor nas formas pulmonares da doença, onde aproximadamente 30% dos casos permanecem sem a confirmação diagnóstica, através dos métodos convencionais. Antes que tais ferramentas se incorporem à rotina diagnóstica, devem-se realizar estudos comparativos e controlados para otimização da técnica, além de análise do desempenho, do custo benefício, e avaliação da possibilidade de ser incorporada pelos serviços de referência em tuberculose da rede do Sistema Único de Saúde (SUS) (ASSIS et al., 2007; LIMA et al., 2009).

Sabe-se que tanto a PCR em tempo real quanto a STNPCR têm sido propostas como metodologias promissoras na detecção do bacilo da tuberculose. Assim, esse estudo visa comparar essas duas técnicas moleculares para avaliar o desempenho de cada uma e se poderiam ser propostas (ambas ou uma delas) como uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico clínico e bacteriológico da TB pulmonar, sobretudo em grupos difíceis de se identificar o *M. tuberculosis* através das metodologias convencionais (pacientes com baciloscopia negativa, HIV positivos, usuários de drogas, crianças, etc). Além disso, propõe a utilização de diferentes amostras biológicas (sangue, urina e escarro) coletadas do mesmo pacientes, afim de aumentar as chances de detecção do bacilo e de fornecer maiores possibilidades diagnósticas onde a coleta da amostra pulmonar seja difícil, como em crianças e pacientes imuno deprimidos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho das técnicas moleculares Nested PCR em um único tubo (STNPCR) e PCR em tempo real (qPCR) na detecção do *M. tuberculosis* em amostras de sangue, urina e escarro coletados de indivíduos com suspeita de TB pulmonar

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar as características clínicas, demográficas e laboratoriais dos pacientes participantes da pesquisa;
- b) Avaliar o desempenho da STNPCR e da qPCR em relação ao padrão ouro estabelecido;
- c) Comparar o desempenho das técnicas de PCR com as técnicas laboratoriais convencionais (baciloscopia e cultura em meio específico);
- d) Comparar o desempenho da Nested PCR em único tubo com a PCR em tempo real

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Para escolha dos pacientes participantes do estudo, foram levados em consideração os seguintes aspectos:

5.1.1 População e local de estudo

Foram selecionados pacientes com suspeita de TB pulmonar, de ambos os sexos, com faixa etária variada, provenientes de ambulatórios ou enfermarias do Hospital das Clínicas (HC/UFPE), Hospital Geral Otávio de Freitas (SUS/PE), Hospital Barão de Lucena (SUS/PE), Hospital Oswaldo Cruz (HUOC/PE), Policlínica Albert Sabin, Posto de Saúde da Família Joaquim Cavalcanti e o Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP). Esses hospitais além de serem de referência para TB, contam com atividades assistenciais e de ensino. O diagnóstico da TB pulmonar e tratamento específico do paciente foram realizados pelo médico assistente de cada serviço público de saúde, conforme recomendações do Ministério da Saúde (2011) e da Sociedade Torácica Americana (BASS, 1990): através da presença do *M tuberculosis* na baciloscopia ou cultura, além da possibilidade de análise radiológica e clínica em casos de exames laboratoriais negativos. As análises moleculares das amostras clínicas coletadas dos pacientes foram realizadas no Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia do Centro de pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ).

5.1.2 Informações do estudo

Trata-se de um estudo comparativo para avaliação de dois testes diagnósticos, em pacientes com tuberculose pulmonar e com outro tipo de patologia respiratória que não a tuberculose. Foi feito de maneira dupla-cega, em que o diagnóstico final do paciente só foi disponibilizado à equipe do laboratório após a conclusão das técnicas moleculares, da mesma maneira que a equipe médica não teve conhecimento destes resultados antes da definição diagnóstica do paciente. Enfatizamos que os resultados das PCRs não foram utilizados como critérios de definição de caso de tuberculose. Foi

considerado, nesse estudo, caso de tuberculose o paciente que apresentava positividade nos exames bacteriológicos e/ou conjunto de critérios clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e resposta ao tratamento específico.

5.1.3 Grupos de estudo

Os indivíduos selecionados para o estudo com suspeita de TB pulmonar foram classificados nos seguintes grupos:

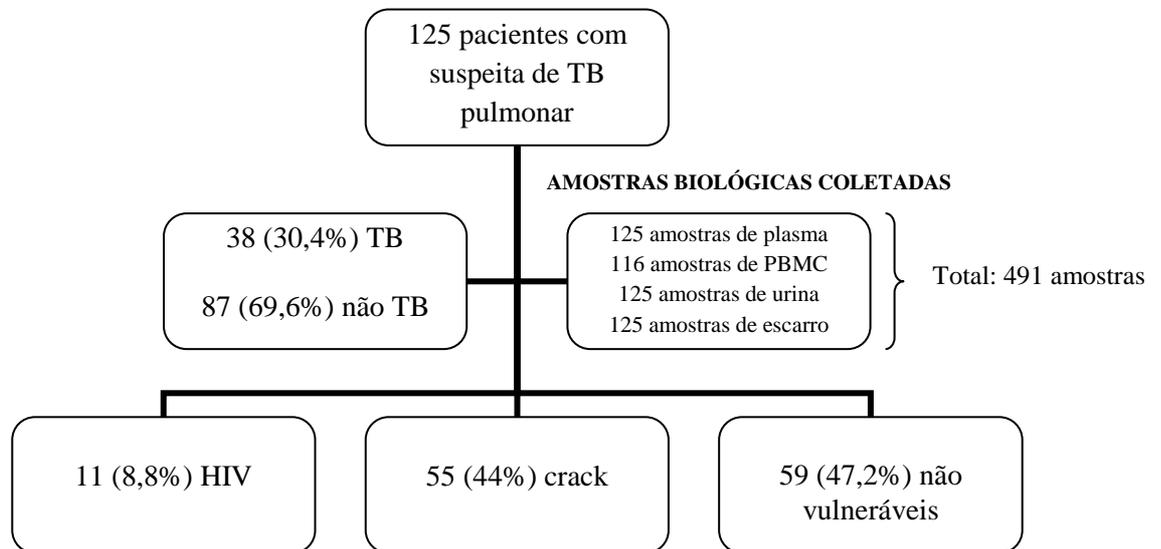
- a) **Pacientes com TB doença:** quadro clínico e/ou radiológico compatível com TB pulmonar ativa e/ou isolamento do *M. tuberculosis* em amostra biológica, através de exame direto e/ou cultura, ou melhora clínica evidente após tratamento específico;
- b) **Pacientes sem TB (controle negativo):** Pacientes sintomáticos respiratórios, que não possuíam quadro clínico e/ou radiológico compatível com TB pulmonar ativa, nem isolamento do *M. tuberculosis* em amostra biológica, através de exame direto e/ou cultura, com diagnóstico de TB afastado pelo médico.

5.1.4 Padrão ouro

Foi considerado, neste estudo, padrão ouro um conjunto de critérios que envolviam a cultura em meio específico e a baciloscopia, quadro clínico, epidemiológico e laboratorial compatível de TB pulmonar e resposta ao tratamento específico (LIRA, 2012; ROZALES, 2013).

5.1.5 Critérios de inclusão

Pacientes sem restrição de idade, de ambos os sexos, com possibilidade de coleta de amostra de escarro, sangue periférico e urina, com suspeita de tuberculose pulmonar ativa detectada pelo médico acompanhante dos serviços de saúde do SUS supracitados e que não tinham iniciado o tratamento específico para TB, sendo incluídos 125 pacientes (Figura 6).

Figura 6 – Esquemática dos pacientes e amostras incluídos na pesquisa.

Fonte: Elaborado pela autora

5.1.6 Critérios de exclusão

Pacientes cujo tratamento para tuberculose já tinha sido iniciado, com impossibilidade clínica de coleta das amostras biológicas e a falta de preenchimento correto da ficha elaborada pela pesquisadora, levando a dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais insuficientes para a definição do diagnóstico final. Pacientes cujas amostras biológicas coletadas foram insuficientes para o processamento no laboratório, contaminação da cultura e pacientes que não retornaram para acompanhamento ambulatorial necessário. Foram excluídos 15 pacientes da pesquisa.

5.1.7 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do CPqAM/Plataforma Brasil, sob registro 743874, CAAE: 30444114.7.0000.5190. Os pacientes foram esclarecidos sobre a pesquisa e receberam um termo de livre consentimento para assinarem, em duas vias, referente à sua participação na pesquisa. No caso de paciente menor de idade ou legalmente incapaz, o seu responsável consentiu a coleta das amostras biológicas necessárias por escrito através do termo de consentimento, e o paciente assinou um

termo de assentimento. As informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais relevantes de cada paciente foram registradas em uma ficha pré-elaborada e depositadas em um banco de dados, para análises estatísticas. O acompanhamento clínico e tratamento destes pacientes foram feitos pelo profissional médico responsável nas unidades de saúde, responsável pelos pacientes que estavam sendo investigados quanto à existência ou não de tuberculose. A pesquisadora tem ciência das resoluções CNS 466/12 e 441/11 e de seus conteúdos, relacionando-os ao tema desse projeto.

5.1.8 Cálculo amostral

Baseado em uma sensibilidade da STNPCR de 70% e especificidade de 95%, com nível de confiança de 95%, e utilizando a população da Região Metropolitana de Recife (1.000.000 habitantes), o tamanho da amostra estimado foi 100 pacientes (81 doentes e 19 não doentes) calculado através do programa OpenEpi (versão 3.03).

5.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

De cada paciente foram coletadas amostras de sangue, urina e escarro.

5.2.1 Sangue

As amostras de sangue foram coletadas de cada paciente por punção intravenosa, em volume de 4,5mL, em tubo contendo EDTA. Após coleta, os elementos sanguíneos (plasma, células mononucleares do sangue periférico – do inglês *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) – e hemácias) foram separados através de centrifugação do tubo a 2000rpm (ou aproximadamente 500G) por 30 minutos utilizando 3mL Ficoll-Histopaque® gelado com o sangue diluído na proporção de 1:2 em solução salina. O plasma e PBMC de cada paciente foram armazenados a -20°C para posterior extração do DNA.

5.2.2 Urina

Foram coletadas de 1 (quando o atendimento se deu a nível ambulatorial e não foi possível a coleta das amostras em dias consecutivos) a 3 amostras de urina, pelo

menos 10mL. A coleta foi realizada, pelo próprio paciente, após higiene local e desprezo do primeiro jato.

5.2.3 Escarro

Foi coletado pelo menos 1mL da amostra de escarro em tubo seco estéril de cada paciente. Os pacientes receberam orientações de como proceder a coleta e a realizaram no momento do atendimento ambulatorial. Eram orientados a realizar assepsia da boca e respirar fundo afim de expelir secreção proveniente do pulmão. As amostras de urinas e escarro foram descontaminadas e semeadas em meio de cultura como descritas a seguir.

5.3 BACILOSCOPIA

A baciloscopia foi realizada pelo serviço de saúde responsável pelo paciente, pelo método de Ziehl-Neelsen, seguindo as recomendações do Manual Nacional de Vigilância da Tuberculose e outras micobactérias (BRASIL, 2008).

5.4 CULTURA E IDENTIFICAÇÃO DE MICROBACTÉRIAS EM MEIO LÖWENSTEIN-JENSEN

Alíquotas das amostras de urina e escarro foram armazenadas a -20°C, antes do processamento, para posterior extração do DNA.

Para o cultivo e a identificação das micobactérias, as amostras de escarro e urina foram descontaminadas pelo método de Petroff NaOH a 4% modificado (BARRETO, 2005). Cerca de 200µL de cada amostra foram divididos e semeados em três tubos contendo o meio Löwenstein-Jensen: 1) um tubo de meio Löwenstein-Jensen (simples) que identifica o gênero *Mycobacterium*; 2) um tubo de meio Löwenstein-Jensen com PNB (ácido para-nitrobenzóico) que identifica cepas de Micobactérias atípicas; 3) um tubo de meio Löwenstein-Jensen com TCH (hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico) para identificar a espécie *Mycobacterium tuberculosis*. Os tubos foram incubados a 37°C, em estufa, onde o crescimento era acompanhado semanalmente por até 8 semanas, ou até que houvesse o crescimento de colônias. Além da identificação por meio de antibióticos adicionados aos meios, as culturas positivas também passavam pela prova da catalase e niacina, identificações bioquímicas que permitiram distinguir

bacilos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* das micobactérias não tuberculosas (BRASIL, 2008). Amostras de sangue não são semeadas para cultura. Todo esse procedimento foi realizado no laboratório de risco de biossegurança NB3 no CPqAM.

5.5 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA do *M. tuberculosis* das amostras biológicas foi realizada através do QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), segundo o protocolo do fabricante.

5.6 CONDIÇÕES DA NESTED PCR EM ÚNICO TUBO (STNPCR)

A STNPCR seguiu os princípios propostos por Abath, Werkhäuser e Melo (2002). A sequência de inserção IS6110 também foi o alvo para essa PCR. Os oligonucleotídeos externos utilizados foram TJ5 (5' - CCG CAA AGT GTG GCT AAC - 3') e TJ3 (5' - ATC CCC TAT CCG TAT GGT G - 3'), que amplificaram um fragmento de 409pb enquanto os oligonucleotídeos internos foram o OLI5 (5' - AAC GGC TGA TGA CCA AAC - 3') e STAN3 (5' - GTC GAG TAC GCC TTC TTG TT - 3'), amplificando um fragmento de 316pb. A padronização desta técnica para detecção do *Mycobacterium tuberculosis* foi descrita por Lima (2009).

As condições da STNPCR foram as seguintes: a reação foi realizada no termociclador GeneAmp Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems, CA, US). A primeira etapa de PCR tem em 15 ciclos, sendo a desnaturação inicial a 94°C por 1 min e os ciclos a 57°C por 1 min e 72°C por 1 min, enquanto que a segunda etapa consistiu em 45 ciclos (94°C - 1min; 60°C - 1min e 72°C - 1min). Na primeira etapa, adicionou-se 5µl de Tris-HCl a 200mM, com pH=8.4, KCl 500mM (Buffer/Tampão 10X), 1µl de cada oligonucleótido externo a 0,5 pmoles, 1µl de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) (5U), 2,5µl de MgCl₂ a 2,5mM, 5µl de dNTP 2mM, completando-se com água Mili-Q para um volume final de 50 µl, com 10µl do DNA extraído das amostras biológicas. Os oligonucleotídeos internos, antes do início da PCR, foram diluídos na mesma proporção com água e azul de bromofenol (2 µg/ml), na concentração de 50 pmoles, e esta mistura foi fixada na superfície interna da tampa dos microtubos abertos, numa estufa a 37°C ou temperatura ambiente. Ao fim dos 15 ciclos da primeira etapa da PCR, os microtubos eram revertidos afim de que o produto de PCR entrasse em contato com os oligonucleotídeos fixados na tampa, podendo dar continuidade aos 45 ciclos que

compunham a segunda etapa da PCR. Em cada reação eram adicionados controles negativo (com 10µl de água Mili-Q no lugar do DNA) e positivo (referente a 2µl do DNA da cepa de referência H37RV do *Mycobacterium tuberculosis*, completado com 8µl de água). O limite de detecção da técnica é 1ag de DNA genômico de *M. tuberculosis* em água, conforme descrito por Lima (2009).

5.7 ELETROFORESE

O produto da STNPCR foi separado em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e corrido a 110V por 40-45 minutos. As bandas de DNA separadas através de eletroforese foram visualizadas em um transluminador de luz ultravioleta e fotografadas com um sistema de documentação Kodak (Gel Logic 100 Imaging System), utilizando o software Kodak molecular imaging software 4.0.0.

5.8 CONDIÇÕES DA PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

A sequência de inserção IS6110 (GenBank accession N°. X52471) foi o alvo utilizado na qPCR. A qPCR foi baseada nos princípios utilizados por Broccolo et al. (2003) utilizando os oligonucleotídeos TAQM3 (5'-AGGCGAACCCCTGCCCCAG-3') e TAQM4 (5'-GATCGCTGATCCGGCCA-3'). A PCR em tempo real foi processada através do sistema ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, CA, US), usando a sonda específica TaqMan 5'-TGTGGGTAGCAGACCTCACCTATGTGTCGA -3' (e ROX como referência passiva). As condições da qPCR foram: desnaturação inicial por 15 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e amplificação a 60°C por 1 minuto. O volume final da reação foi de 25µl, sendo 12,5µl do master mix do kit TaqMan, 1µl de cada *primer* na concentração de 300nM (oligonucleotídeo), 1µl da sonda a 200nM e 9µl do DNA, completando com água Mili-Q. Cada reação de qPCR foi realizada em conjunto com uma curva de diluição de bacilos em amostra de urina com limite de detecção de 3×10^0 bacilos/ml, que funciona como controle positivo e como critério para positividade das amostras, conforme descrito por Santos (2012) e Lira (2012). Além disso também foram utilizados controles negativos, onde não se adicionou DNA, mas apenas água Mili-Q. Os produtos de PCR foram detectados pela fluorescência emitida pela sonda TaqMan ao ser degradada pela atividade de exonuclease 5'-3' da enzima polimerase. A análise,

interpretação e registro dos resultados foram realizadas através do software ABI PRISM 7500 SDS (versão 1.4 e 2.0.4).

5.9 ANÁLISE ESTADÍSTICA

A sensibilidade (S), especificidade (E), sensibilidade em paralelo, o valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e índice Kappa dos testes foram calculadas como descrito em Ferreira e Ávila (2001), através dos programas OpenEpi (versão 3.03), EpiInfo (versão 6.04) e IBM SPSS Statistics (versão 22). Este último também serviu para introduzir e analisar os dados e resultados da pesquisa. Para expressar a confiabilidade de um teste foi utilizado o índice kappa. O kappa informa a proporção de concordância não aleatória (além da esperada pela chance) entre observadores ou medidas da mesma variável categórica, e seu valor varia de "menos 1" (completo desacordo) a "mais 1" (concordância total) (OPAS, 2015). Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES ESTUDADOS

Foram selecionados 125 pacientes com suspeita de TB pulmonar, sendo 11 (8,8%) portadores de HIV e 55 (44%) usuários de crack. Da totalidade, 38 (30,4%) apresentaram como diagnóstico final tuberculose pulmonar, enquanto 87 (69,6%) foram classificados como pertencentes ao grupo “não TB”. O posto de saúde com atendimento mais representativo foi o Posto de Saúde Joaquim Cavalcanti, com 23 indivíduos (18,4%). Entre os pacientes selecionados, 76 (60,8%) eram do sexo masculino e 49 (39,2%) do sexo feminino. As idades variaram de 1 a 80 anos, com média de 36 anos (± 16) e mediana de 33 anos. Dos 125 indivíduos, 42 possuíam radiografia de tórax. Desses, 12 (28,6%) não apresentaram alterações radiológicas e 30 (71,4%) apresentaram alterações pulmonares. Em relação à baciloscopia de escarro, 91 realizaram esse exame, sendo 10 (11%) positivas e 81 (89%) negativas. Todos os 125 pacientes realizaram cultura de escarro e urina, totalizando 250 amostras semeadas. A cultura de escarro foi positiva em 26 (20,8%) pacientes, sendo 23 TB doença e 3 pacientes com micobacteriose atípica, enquanto a de urina em 4, todos com TB pulmonar (3,25%). As características clínicas, demográficas, e laboratoriais dos pacientes analisados estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Características demográficas e laboratoriais dos indivíduos analisados. N = 125.

(continua)

	N	%
Diagnóstico		
TB pulmonar	38	30,4
Não TB	87	69,6
Idade		
1 a 15 anos	9	7,2
16 a 39 anos	65	52
40 a 59 anos	34	27,2
≥ 60 anos	12	9,6
Não informado	5	4

Tabela 1 – Características clínicas, demográficas e laboratoriais dos indivíduos analisados. N = 125.
(conclusão)

	N	%
Sexo		
Masculino	76	60,8
Feminino	49	39,2
Raio-X (Grupo TB doença)		
Alterações sugestivas para TB	18	47,4
Sem alterações sugestivas	4	10,5
Não realizado	16	42,1
Raio-X (Grupo Não TB)		
Alterações compatíveis com outras doenças respiratórias*	12	13,8
Sem alterações	8	9,2
Não realizado	67	77
Baciloscopia (Grupo TB doença)		
Positiva	10	26,4
Negativa	14	36,8
Não realizado	14	36,8
Baciloscopia (Grupo Não TB)		
Positiva	0	0
Negativa	67	77
Não realizado	20	23
Cultura (Grupo TB doença)		
Positiva no escarro	23	60,5
Positiva na urina	4	10,5
Cultura (Grupo Não TB)		
Negativa no escarro	84	96,5
Negativa na urina	87	100

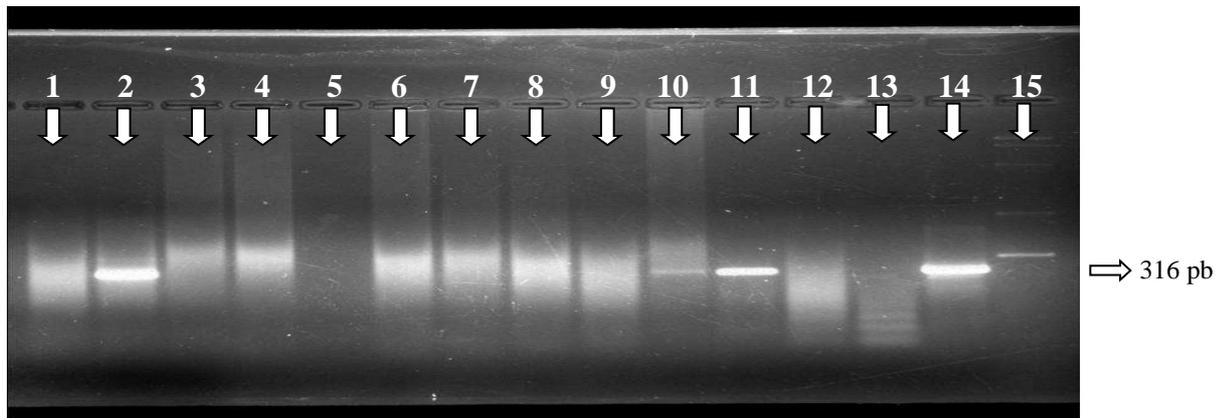
Fonte: elaborado pela autora

Nota: * Pneumonia ou broncopneumonia aguda, bronquite, entre outras.

6.2 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA STNPCR NA DETECÇÃO DO *M. TUBERCULOSIS* EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM SUSPEITA DE TB PULMONAR

A STNPCR foi realizada em todas as 491 amostras biológicas. Das 125 amostras de plasma analisadas através da STNPCR, 7 (5,6%) foram positivas e 118 (94,4%) foram negativas. Já entre as PBMC, 6 foram positivas (4,8%), 110 negativas (88%) e em 9 pacientes não foi possível o isolamento dessa camada celular (7,2%). Amostras de plasma e PBMC foram analisadas em conjunto, como sangue. Entre as 125 amostras de urina, 4 (3,2%) foram positivas e 121 (96,8%) negativas e amostras de escarro 9 (7,2%) foram positivas e 116 (92,8%) negativas. A figura 6 esquematiza um resultado da STNPCR na detecção do DNA do bacilo da tuberculose.

Figura 7 – Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio com amostras de pacientes, sendo os poços 2, 10 e 11 pacientes positivos, o controle positivo de 316pb (poço 14) e o marcador de peso molecular de 100pb no poço 15.



Fonte: elaborado pela autora

Utilizando apenas a cultura de escarro como padrão ouro, podemos observar o seguinte desempenho da STNPCR, em cada amostra biológica: a sensibilidade da STNPCR em amostras de sangue foi 15,4% (IC = 1,5 a 29,3) e a especificidade 91,9% (IC = 86,6 a 97,3), com índice kappa pobre de 0,091 e $p=0,130$. Já em amostras de urina a sensibilidade da STNPCR foi 3,8% (IC= -3,5 a 11,2) e a especificidade foi 97% (IC= 93,6 a 100,3), com índice kappa pobre igual a 0,011 e $p=0,417$. Em amostras de escarro, a STNPCR apresentou sensibilidade de 23,1% (IC= 6,9 a 39,3) e especificidade de 97% (IC= 93,3 a 100,3), com índice kappa fracamente concordante de 0,264, mas concordância altamente significativa com $p<0,001$ (Tabela 2).

Sabe-se que todos os pacientes tiveram os três tipos de amostra coletadas (sangue, urina e escarro). Ao avaliar um paciente como “positivo”, ou seja, ao analisar suas amostras conjuntamente, obtendo qualquer uma resultado positivo, a STNPCR apresentou sensibilidade em paralelo de 30,8% (IC= 13 a 48,5), especificidade 88,9% (IC= 82,7 a 95,1) e índice kappa fraco igual a 0,218 e $p=0,006$ (Tabela 2).

Tabela 2 – Desempenho da STNPCR em pacientes com suspeita de TB pulmonar, utilizando cultura como padrão ouro.

Cultura – IC 95%				Análise estatística
STNPCR	TB	Não TB	Total	
Sangue				S = 15,4%; E = 91,9%
Positiva	4	8	12	VPP = 33,3%; VPV = 80,5%
Negativa	22	91	113	Índice kappa = 0,091
Total	26	99	125	p=0,130
Urina				S = 3,8%; E = 97%
Positiva	1	3	4	VPP= 25%; VPV = 79,3%
Negativa	25	96	121	Índice kappa = 0,011
Total	26	99	125	p=0,417
Escarro				S = 23,1%; E = 97%
Positiva	6	3	9	VPP = 66,7%; VPV = 82,8%
Negativa	20	96	116	Índice kappa = 0,264
Total	26	99	125	p<0,001
Qualquer amostra				S = 30,8%; E = 88,9%
Positiva	8	11	19	VPP = 42,1%; VPV = 83%
Negativa	18	88	106	Índice kappa = 0,218
Total	26	99	125	p=0,006

Fonte: elaborado pela autora

6.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA STNPCR NA DETECÇÃO DO *M. TUBERCULOSIS* EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM SUSPEITA DE TB PULMONAR UTILIZANDO CULTURA E/OU DIAGNÓSTICO CLÍNICO E A RESPOSTA TERAPÊUTICA

Utilizando a cultura e/ou diagnóstico clínico e a resposta terapêutica como padrão ouro, podemos observar o seguinte desempenho da STNPCR, em cada amostra biológica: 3m amostras de sangue, a STNPCR apresentou sensibilidade de 26,3% (IC= 12,3 a 40,3) e especificidade de 97,7% (IC=94,6 a 100,9), com índice kappa fraco de 0,297, mas altamente significativo ($p < 0,001$). A sensibilidade da STNPCR, em amostras de urina, foi 7,9% (IC= -0,7 a 16,5) e a especificidade foi 98,9 (IC= 96,6 a 101,1), com índice kappa de 0,090 e $p = 0,02$. Já em amostras de escarro, a STNPCR apresentou sensibilidade de 21,1% (IC= 8,1 a 34) e especificidade de 98,9 (IC=96,6 a 101,1), com índice kappa fraco igual a 0,253 e $p < 0,001$. A STNPCR apresentou sensibilidade em paralelo de 44,7% (IC= 28,9 a 60,5), especificidade 97,7% (IC= 94,6 a 100,9) e índice kappa representando concordância moderada igual a 0,493 e significativo ($p = 0$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Desempenho da STNPCR em pacientes com suspeita de TB pulmonar, utilizando cultura e/ou o diagnóstico clínico e a resposta terapêutica como padrão ouro.

Cultura e/ou diagnóstico clínico e resposta terapêutica– IC 95%				Análise estatística
STNPCR	TB	Não TB	Total	
Sangue				S = 26,3%; E = 97,7%
Positiva	10	2	12	VPP = 83,3%; VPN = 75,2%
Negativa	28	85	113	Índice kappa = 0,287
Total	38	87	125	p<0,001
Urina				S = 7,9%; E = 98,9%
Positiva	3	1	4	VPP= 75%; VPN = 71,1%
Negativa	35	86	121	Índice kappa = 0,090
Total	38	87	125	p=0,02
Escarro				S = 21,1%; E = 98,9%
Positiva	8	1	9	VPP = 88,9%; VPN = 74,1%
Negativa	30	86	116	Índice kappa = 0,253
Total	38	87	125	p<0,001
Qualquer amostra				S = 44,7%; E = 97,7%
Positiva	17	2	19	VPP = 89,5%; VPN = 80,2%
Negativa	21	85	106	Índice kappa = 0,493
Total	38	87	125	p=0

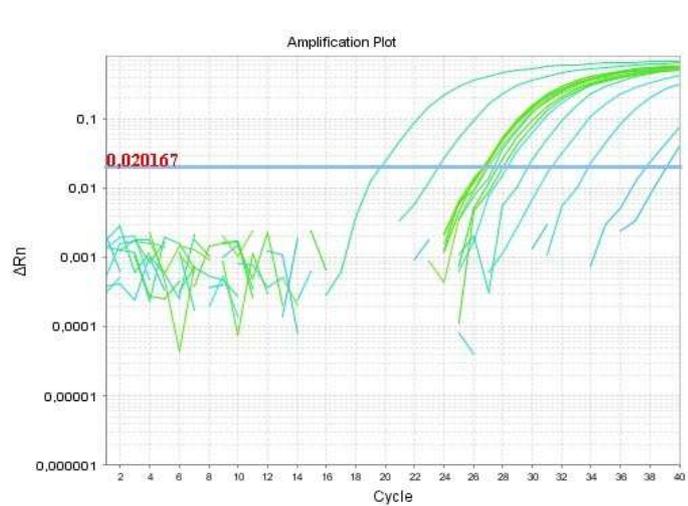
Fonte: elaborado pela autora

6.4 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA qPCR NA DETECÇÃO DO *M. TUBERCULOSIS* EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM SUSPEITA DE TB PULMONAR

Foram analisadas 491 amostras através da qPCR. Das 125 amostras de plasma, 10 (8%) foram positivas enquanto 115 (92%) foram negativas. Entre as PBMC, 7 foram

positivas (5,6%), 109 (87,2%) foram negativas e em 9 pacientes (7,2%) não foi possível isolar as PBMC. Em as amostras de urina, a qPCR foi capaz de detectar do bacilo em 36 (28,8%) amostras, enquanto 89 (71,2%) foram negativas. Nas amostras de escarro, 18 (14,4%) obtiveram positividade e 107 (85,6%) foram negativas. A figura 7 esquematiza um resultado da qPCR.

Figura 8 – Gráfico de amplificação das amostras biológicas juntamente com a curva padrão (3×10^7 bacilos/ml a 3×10^1 bacilos/mL).



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda:

Curvas azuis – curva padrão

Curvas verdes – amostras de pacientes

Utilizando apenas a cultura como padrão ouro, podemos observar o seguinte desempenho da qPCR, em cada amostra biológica: a sensibilidade da qPCR em amostras de sangue foi 19,2% (IC = 4,1 a 34,4) e a especificidade 90,9% (IC = 85,2 a 96,6), com índice kappa pobre de 0,122 e $p=0,07$. A sensibilidade da qPCR, em amostras de urina, foi 38,5% (IC= 19,8 a 57,2) e a especificidade foi 73,7 (IC= 65,1 a 82,4), com índice kappa pobre de 0,106 e $p=0,11$. Já em amostras de escarro, a qPCR apresentou sensibilidade de 30,8% (IC= 13 a 48,5) e especificidade de 89,9% (IC= 84 a 95,8), com índice kappa fraco igual a 0,233 e $p=0,003$. Ao avaliar as amostras conjuntamente, a qPCR apresentou sensibilidade em paralelo de 46,2% (IC = 27 a 65,3) e especificidade 69,7% (IC = 60,6 a 78,7), com um índice kappa pobre igual a 0,129 e $p=0,06$ (Tabela 4).

Tabela 4 – Desempenho da qPCR em pacientes com suspeita de TB pulmonar, utilizando cultura como padrão ouro.

Cultura – IC 95%				Análise estatística
qPCR	TB	Não TB	Total	
Sangue				S = 19,2%; E = 90,9%
Positiva	5	9	14	VPP = 35,7%; VPB = 81,1%
Negativa	21	90	111	Índice kappa = 0,122
Total	26	99	125	p=0,07
Urina				S = 38,5%; E = 73,3%
Positiva	20	26	36	VPP= 27,8%; VPB = 82%
Negativa	26	73	89	Índice kappa = 0,106
Total	26	99	125	p=0,11
Escarro				S = 30,8%; E = 89,9%
Positiva	8	10	18	VPP = 44,4%; VPB = 83,3%
Negativa	18	89	107	Índice kappa = 0,233
Total	26	99	125	p=0,03
Qualquer amostra				S = 46,2%; E = 69,7%
Positiva	12	30	42	VPP = 28,6%; VPB = 83,1%
Negativa	14	69	83	Índice kappa = 0,129
Total	26	99	125	p=0,06

Fonte: elaborado pela autora

6.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA qPCR NA DETECÇÃO DO *M. TUBERCULOSIS* EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES COM SUSPEITA DE TB PULMONAR UTILIZANDO A CULTURA E/OU DIAGNÓSTICO CLÍNICO E RESPOSTA TERAPÊUTICA COMO PADRÃO OURO

Utilizando a cultura e/ou diagnóstico clínico e a resposta terapêutica como padrão ouro, podemos observar o seguinte desempenho da qPCR, em cada amostra

biológica: a sensibilidade da qPCR em amostras de sangue foi 26,3% (IC = 12,3 a 40,3) e a especificidade foi 95,4% (IC = 91 a 99,8), com índice kappa fraco de 0,264 e altamente significativa ($p < 0,001$). A sensibilidade da qPCR, em amostras de urina, foi 47,4% (IC= 31,5 a 63,2) e a especificidade foi 79,3 (IC= 70,8 a 87,8), com índice kappa fraco de 0,270 e significativa ($p = 0,001$). Já em amostras de escarro, a qPCR apresentou sensibilidade de 36,8% (IC= 21,5 a 52,2) e especificidade de 95,4% (IC= 91 a 99,8, com índice kappa fraco igual a 0,378 e $p = 0$). Ao avaliar um paciente como “positivo”, a qPCR apresentou sensibilidade em paralelo de 65,8% (IC= 50,7 a 80,9), especificidade 79,3% (IC= 70,8 a 87,8) e índice kappa igual moderado a 0,434 com $p = 0$ (Tabela 5).

Tabela 5 – Desempenho da qPCR em pacientes com suspeita de TB pulmonar, utilizando cultura e/ou o diagnóstico clínico e a resposta terapêutica como padrão ouro.

Cultura e/ou diagnóstico clínico e resposta terapêutica– IC 95%				Análise estatística
qPCR	TB	Não TB	Total	
Sangue				S = 26,3%; E = 95,4%
Positiva	10	4	14	VPP = 71,4%; VPN = 74,8%
Negativa	28	83	111	Índice kappa = 0,264
Total	38	87	125	$p < 0,001$
Urina				S = 47,4%; E = 79,3%
Positiva	18	16	36	VPP= 50%; VPN = 77,5%
Negativa	20	69	89	Índice kappa = 0,270
Total	38	87	125	$p = 0,001$
Escarro				S = 36,8%; E = 95,4%
Positiva	14	4	18	VPP = 77,8%; VPN = 77,6%
Negativa	24	83	107	Índice kappa = 0,378
Total	38	87	125	$p = 0$
Qualquer amostra				S = 65,8%; E = 79,3%
Positiva	25	18	43	VPP = 58,1%; VPN = 84,1%
Negativa	13	69	82	Índice kappa = 0,434
Total	38	87	125	$p = 0$

6.6 DESEMPENHO DAS TÉCNICAS EM GRUPOS DE RISCO

6.6.1 HIV

Entre os 11 portadores de HIV, a STNPCR apresentou sensibilidade em paralelo de 87,5% (IC = 64,6 a 110,4), a especificidade de 100% e o índice kappa de 0,792 representando boa concordância e significância $p=0,003$ (Tabela 6).

Tabela 6 – Desempenho da STNPCR em qualquer amostra de pacientes portadores do HIV.

Cultura e/ou diagnóstico clínico e a resposta terapêutica – IC 95%			
STNPCR qualquer amostra	TB doença	Não TB	Total
Positiva	7	0	7
Negativa	1	3	4
Total	8	3	11

Fonte: elaborado pela autora

Nota: S = 87,5%; E = 100%; VPP = 100%; VPN = 75; índice kappa = 0,792

Já a qPCR apresentou sensibilidade em paralelo, nesse grupo de pacientes, igual a 100% e a especificidade foi 66,7% (IC = 13,3 a 120), com índice kappa igualmente bom de 0,744 com $p=0,005$ (Tabela 7).

Tabela 7 – Desempenho da qPCR em qualquer amostra de pacientes portadores do HIV.

Cultura e/ou diagnóstico clínico e a resposta terapêutica – IC 95%			
qPCR qualquer amostra	TB doença	Não TB	Total
Positiva	8	1	9
Negativa	0	2	2
Total	8	3	11

Fonte: elaborado pela autora

Nota: S = 100%; E = 66,7%; VPP = 88,9%; VPN = 100%; índice kappa = 0,744

Desses 11 pacientes, dos pertencentes ao grupo “TB”, 2 tinham baciloscopia positiva, 1 negativa e 5 não realizaram, enquanto os 3 restantes pertencentes ao grupo “não TB” não realizaram.

6.7 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA BACILOSCOPIA EM AMOSTRAS DE ESCARRO DOS PACIENTES ESTUDADOS

A baciloscopia foi realizada somente em amostras de escarro, de 91 pacientes. O exame apresentou sensibilidade de 41,7% (IC= 21,9 a 61,4) e especificidade de 100%, com índice kappa moderado de 0,512 e $p=0$ (Tabela 8).

Tabela 8 – Desempenho da baciloscopia em amostras de escarro em pacientes com suspeita de TB pulmonar.

Baciloscopia de escarro – IC 95%			
	TB doença	Não TB	Total
Positiva	10	0	10
Negativa	14	67	81
Total	24	67	91

Fonte: elaborado pela autora

Nota: S = 41,7%; E = 100%; VPP = 100%; VPN = 82,7%; índice kappa = 0,512

6.8 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA CULTURA EM AMOSTRAS DE URINA E ESCARRO DOS PACIENTES ESTUDADOS

Quando avaliada em relação ao diagnóstico clínico final do paciente, com sua resposta ao tratamento específico para tuberculose, a cultura de urina apresentou sensibilidade de 10,5% (IC= 0,8 a 20,3) e especificidade 100%, com índice kappa pobre de 0,140 e $p=0,001$ (Tabela 9).

Já a cultura de escarro apresentou sensibilidade igual a 60,5% (IC= 45 a 76,1) e especificidade de 96,6% (IC= 92,7 a 100,4), com um índice kappa bom de 0,626 e $p=0$ (Tabela 10).

Tabela 9 – Desempenho da cultura em amostras de urina em pacientes com suspeita de TB pulmonar.

Cultura de urina – IC 95%			
	TB doença	Não TB	Total
Positiva	4	0	4
Negativa	34	87	121
Total	38	87	125

Fonte: elaborado pela autora

Nota: S = 10,5%; E = 100%; VPP = 100%; VPB = 71,9%; índice kappa = 0,140

Tabela 10 – Desempenho da cultura em amostras de escarro em pacientes com suspeita de TB pulmonar.

Cultura de escarro – IC 95%			
	TB doença	Não TB	Total
Positiva	23	3	26
Negativa	15	84	99
Total	38	87	125

Fonte: elaborado pela autora

Nota: S = 60,5%; E = 96,6%; VPP = 88,5%; VPB = 84,8%; índice kappa = 0,626

8.9 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DA STNPCR COM A qPCR

Na tabela 11 pode-se observar uma comparação dos desempenhos das duas técnicas moleculares, bem como uma comparação com as metodologias convencionais. Foram calculados os valores de p da sensibilidade, especificidade e dos valores preditivos positivo e negativo, das duas técnicas moleculares.

Tabela 11 – Comparação dos desempenhos das técnicas diagnósticas da TB pulmonar, em porcentagem.

	Baciloscopia de escarro	Cultura escarro	Cultura urina	STNPCR	qPCR
Sensibilidade	41,7	60,5	10,5	44,7 ¹	65,8 ¹
Especificidade	100	96,6	100	97,7 ²	79,3 ²
VPP	100	88,5	100	89,5 ³	58,1 ³
VPN	82,7	84,8	71,9	80,2 ⁴	84,1 ⁴

Fonte: elaborado pela autora

¹p<0,001

²p<0,001

³p<0,001

⁴p=0,410

7 DISCUSSÃO

A tuberculose permanece como um importante problema de saúde pública mundial. É uma das principais doenças infecciosas causadas por bactérias e a TB pulmonar é forma mais comum de apresentação da doença. Um diagnóstico precoce e acurado da tuberculose é importante para o manejo adequado da doença, sendo a rápida detecção do *Mycobacterium tuberculosis* de importância primária para a redução da transmissão nos pacientes, permitindo uma terapia adequada e a implementação de medidas efetivas para seu controle (GILL; KUKREJA; CHHABRA, 2013; ROZALES et al., 2013).

O perfil epidemiológico da doença vem se mantendo ao longo dos anos. Sabe-se que, em 2012, o sexo masculino apresentou um coeficiente de incidência de 50,2/100.000 habitantes (2,1 vezes maior que o do sexo feminino), no Brasil. Observa-se também que, entre os homens, a faixa etária mais acometida é a de 40 a 59 anos e para as mulheres é a de 20 a 39 anos (SVS, 2013). Nesse estudo, onde os pacientes foram selecionados de maneira aleatória, a predominância também foi em indivíduos do sexo masculino, com uma taxa 1,55 vezes maior. A faixa etária mais acometida foi de 16 a 39 anos, tanto por indivíduos do sexo masculino (n = 41) quanto por mulheres (n = 24). As possíveis explicações para o fato de o maior risco estar entre os homens podem estar relacionadas a fatores biológicos, tipo de trabalho ou subnotificações do sexo feminino. Em muitos países, mulheres têm menos acesso às facilidades diagnósticas, além das diferenças epidemiológicas reais entre homens e mulheres como exposição e susceptibilidade à infecção (PALOMINO; LEÃO; RITACCO, 2007; VENDRAMINI et al., 2005).

As metodologias convencionais para o diagnóstico da doença envolvem a baciloscopia e a cultura das amostras. A baciloscopia, apesar de rápida e barata, é pouco sensível. A cultura geralmente é mais específica e sensível, mas seu resultado é demorado, podendo levar de 4 a 8 semanas (HAJIABDOLBAGHI et al., 2014). A sensibilidade da baciloscopia normalmente varia de 50 a 60% (ASSIS et al., 2011). Chan et al. (1996) relataram sensibilidade de 45% e 69% variando entre amostras extrapulmonares e pulmonares, enquanto Rozales et al. (2013) encontraram uma sensibilidade de 43,1% e uma especificidade de 100% em amostras pulmonares. Observamos, nesse estudo, uma sensibilidade de 41,7% e uma especificidade de 100%, se aproximando bastante do estudo de Rozales e colaboradores (2013). Entre o grupo de

doentes (n=38), essa técnica foi realizada em 24 pacientes e não detectou o bacilo em 14. Dentre esses 14, todos tiveram resultados positivos na cultura e/ou testes moleculares, provavelmente por serem técnicas mais sensíveis. A baciloscopia, assim como as técnicas moleculares, é um exame dependente de uma coleta adequada da amostra, sendo que uma amostra colhida de forma inadequada pode influenciar no seu desempenho. A amostra ideal corresponde a um volume de 3 a 5 mL de material mucóide ou mucopurulento, sendo inadequada a coleta de saliva. Nas regiões com alta prevalência de infecção pelo HIV, o rendimento da baciloscopia pode ser ainda menor, uma vez que as amostras de escarro desses pacientes costumam ser paucibacilares (GUERRA; REGO; CONDE, 2008). Em nosso estudo 8,8% da população analisada era portadora de HIV. Nessa população, as técnicas STNPCR e qPCR apresentaram boa capacidade de detecção da tuberculose, com sensibilidade de 87,5%.

Encontrou-se na população estudada 44% de usuários de crack. O consumo de crack contribui para transmissão e contaminação de doenças entre os usuários, por diminuir as defesas imunitárias e por expor as pessoas a diversas situações e comportamentos de risco, destacando-se entre essas doenças a tuberculose. Apesar das medidas de proteção e ações de educação ofertadas aos usuários de crack, considera-se que esses apresentam maior risco de se contaminarem com a TB, bem como de abandonarem o tratamento, devido à sua vulnerabilidade social, psicológica e clínica (CRUZ et al., 2013; CASSIANO, 2014). Entretanto neste estudo não observou-se alta e frequência da doença nesses pacientes, com apenas 6 (10,9%) dos 55 usuários de crack pertencentes ao grupo TB doença. Esses resultados, provavelmente, podem ser justificados pelas amostras coletadas de maneira inadequada, em quantidade insuficiente e/ou em acondicionamento duvidoso. A coleta inadequada da amostra, que foi observada na maioria dos pacientes desse grupo, pode levar a uma dificuldade na detecção de casos e também no desempenho das técnicas moleculares.

A cultura usualmente apresenta uma sensibilidade que varia de 80 a 85% (HUF; KRITSKI, 2012). No trabalho de Chan et al. (1996) a cultura apresentou sensibilidade de 67% em amostras pulmonares e 15% em amostras extrapulmonares. Observou-se uma sensibilidade de 60,5% no escarro e 10,5% na urina, resultados semelhantes aos de Chan, que utilizou um “n” bem maior. A cultura em amostras extrapulmonares geralmente apresenta resultados pouco sensíveis, por estas se tratarem de amostras paucibacilares. Essas metodologias, baciloscopia e cultura, visualmente apresentam falhas em seu desempenho, sobretudo em amostras paucibacilares, dificultando a

detecção do bacilo, além de demandar longo tempo para confirmação do resultado, no caso da cultura.

Para tentar suprir estas dificuldades, a PCR vem sendo uma ferramenta amplamente avaliada para obtenção de um diagnóstico mais sensível e rápido de inúmeras doenças infecciosas, incluindo a TB (LIRA et al., 2012; ROZALES et al., 2013).

Apesar da PCR convencional ser útil na detecção do *M. tuberculosis*, estudos têm relatado a importância da utilização da NPCR para esse diagnóstico, pois esta técnica possui melhor sensibilidade e especificidade (CRUZ et al., 2011; GILL; KUKREJA; CHHABRA, 2013; MONTENEGRO et al., 2013; ROZALES, 2013).

Chan et al. (1996) utilizaram um sistema de Nested PCR em único tubo para detecção do alvo IS6110 do *Mycobacterium tuberculosis* onde há diferentes temperaturas de anelamento para os oligonucleotídeos (88°C para os externos e 70°C para os internos), que são colocados no mesmo tubo. Ele analisou 1497 amostras pulmonares, onde obteve sensibilidade de 89%, e 536 amostras extrapulmonares, com sensibilidade de 42%. Esses resultados foram melhores do que os apresentados nesse estudo, no que se refere às amostras pulmonares, devido muito provavelmente ao elevado número de amostras utilizadas, o que permite uma maior possibilidade de caracterizar os pacientes portadores de TB pulmonar. Apesar disso, Chan et al. (1996) destacam a presença de inibidores nas amostras clínicas, principalmente nas extrapulmonares, o que pode levar a uma diminuição do desempenho da técnica.

Abath, Werkhäuser e Melo (2002) padronizaram a STNPCR com a fixação dos oligonucleotídeos internos na tampa do mesmo tubo onde ocorre a reação. Diversos estudos têm utilizado esta técnica para detecção de inúmeros patógenos em diversas amostras clínicas (GOMES et al., 2007; MELO, 2006; PONTES et al., 2014; SILVA et al., 2013). Lima (2009) padronizou a mesma STNPCR para detecção do alvo IS6110 do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

O estudo de Lima (2009) utilizou 104 pacientes, com 301 amostras, envolvendo pacientes suspeitos de formas pulmonares (3,32%) e extrapulmonares (96,68%) da doença. A sensibilidade e especificidade, analisando a TB pulmonar, em amostras de plasma e PBMC foram, respectivamente 20,8% e 89,7%; 40,9% e 89,7%. A sensibilidade em amostras de urina foi 16,7% e a especificidade 89,7%. O estudo não avaliou amostras de escarro. A sensibilidade em paralelo, considerando qualquer uma

das amostras coletadas do mesmo paciente como positivo, conforme descrito por Medronho et al. (2002), foi 65,6%, enquanto a especificidade foi 89,74%.

Salazar (2012) utilizou a mesma metodologia para analisar 259 pacientes, totalizando 203 amostras de escarro, 180 amostras de sangue e 160 amostras de urina. Nem todos os pacientes tiveram todas as amostras coletadas. A amostra de escarro foi que apresentou melhores resultados com sensibilidade de 70,8% e especificidade de 98,5%, enquanto a urina apresentou os piores, com sensibilidade = 21,7% e especificidade = 97,8%. A sensibilidade em amostras de sangue, que apesar de ter sido separado em plasma e PBMC foi analisado como uma só amostra para aumentar a positividade do teste, foi 48,7% e a especificidade foi 95,1%. Neste estudo, apesar do “n” ser menor, foi possível coletar de todos os 125 pacientes as três amostras simultaneamente (sangue, urina e escarro), totalizando 491 amostras analisadas. Optou-se pela utilização de um conjunto de critérios epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e terapêuticos como padrão ouro, afim de aumentar a detecção de casos, e devido à realidade da rotina diagnóstico no caso da TB pulmonar, onde muitos casos são fechados pelos médicos sem a comprovação bacteriológica. A utilização desse padrão ouro representou um aumento de até 13,9% na sensibilidade da STNPCR. A amostra de escarro apresentou sensibilidade de 21,1% e especificidade de 98,9%. Nosso estudo também utilizou as amostras de plasma e PBMC conjuntamente, considerando o resultado de uma ou outra e caracterizando como amostra de “sangue”, aumentando em mais de 10% a sensibilidade da técnica nesse tipo de amostra: em amostras de sangue a sensibilidade foi 26,3% e a especificidade 97,7%. Por outro lado nas amostras de urina, a técnica apresentou menor desempenho, com valores de sensibilidade e especificidade de 7,9% e 98,9%, respectivamente, concordando com os resultados de Lima (2009) e Salazar (2012), que demonstraram que a STNPCR é pouco sensível na detecção de DNA de bacilos na urina de pacientes cuja forma de tuberculose não seja a renal. Entretanto, ao analisar a sensibilidade em paralelo, a mesma subiu para 44,7%, enquanto a especificidade foi 97,7%, representando um aumento que variou de 18,4 a 36,8% na sensibilidade da STNPCR. A STNPCR é uma técnica reprodutível, que tende a manter desempenho bastante semelhante em diversas análises e em diferentes amostras. Apesar dos baixos valores de índice kappa observados, demonstrando uma concordância de pobre a moderada, os valores foram altamente significantes, principalmente quando analisadas as amostras de sangue, escarro e em conjunto, sendo que esta última apresentou maior concordância ($k=0,493$). Entretanto a STNPCR

apresenta a desvantagem de ter a detecção do seu resultado em gel de agarose, o que torna a leitura do resultado algo subjetivo.

Com o passar dos anos, uma melhora significativa na tecnologia da PCR foi alcançada com o desenvolvimento da variante PCR em tempo real. Suas principais vantagens são rapidez, automatização, que reduz a necessidade de manuseio e o risco de contaminação, além da alta sensibilidade e especificidade (ROSALEZ et al., 2013). Com o seu desenvolvimento, diversos autores padronizaram a tecnologia para sua rotina, adaptando a variante de acordo com as suas necessidades (FRANCISCHINI; SUMITA; WHITTLE, 2013; LUTZ et al., 2013; MONTEIRO et al., 2012; SANTOS, 2014). Broccolo et al. (2003) padronizaram um sistema para detecção do mesmo alvo, IS6110, do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo este mesmo protocolo de qPCR padronizado no Brasil por Lira (2009), que testou a PCR em tempo real e seu limite de detecção em amostras clínicas em pacientes com TB pulmonar. Uma vez padronizado, o protocolo pode ter sido testado separadamente em amostras pulmonares e extrapulmonares por Lira (2012) e Santos (2012), respectivamente.

No estudo de Lira (2012) apenas amostras de escarro foram testadas. Foram analisados 165 pacientes suspeitos de TB pulmonar. Nessas amostras, ao utilizar a cultura e/ou a resposta ao tratamento específico como padrão ouro, a PCR em tempo real apresentou a sensibilidade de 87,9% e especificidade de 98%, sendo que a maioria dos pacientes possuía baciloscopia positiva. O estudo de Santos (2012) tratou de selecionou pacientes suspeitos de TB extrapulmonar, entretanto com ele podemos observar o desempenho da PCR em tempo real em amostras de sangue e urina. Foram analisados 57 pacientes, entre amostras de sangue, urina, biópsia e outros líquidos (pleural, líquido céfalo-raquidiano – LCR, ascítico). As amostras de plasma e PBMC, nesse estudo, também foram analisadas em conjunto, para melhorar o desempenho da técnica, totalizando 49 amostras de sangue. Foi observado uma sensibilidade de 55,9% e especificidade igual a 80%. Em amostras de urina, com 46 amostras coletadas, a qPCR apresentou sensibilidade de 33,3% e especificidade de 100%. Ao analisar amostras de sangue e urina conjuntamente, Santos (2012) observou uma sensibilidade de 68,6% e uma especificidade de 78,6%. No nosso estudo, observamos que a detecção da qPCR foi melhor em amostras de urina, com sensibilidade de 47,4% e especificidade de 79,3%. Já em amostras de escarro, que usualmente apresentam melhor desempenho pelos pulmões serem o foco inicial da infecção, observamos uma detecção menor do que se esperava, com sensibilidade de 36,8% e especificidade de 95,4%. Provavelmente

por não se ter um padrão ouro bem definido, levando muitas vezes a uma diagnóstico clínico provável, mas sem a comprovação bacteriológica, podendo levar a uma interpretação falha do desempenho da técnica. Ao analisar o sangue, a sensibilidade foi 26,3% e a especificidade 95,4%, que também teve a sensibilidade aumentada quando analisado como o conjunto dos elementos plasma e PBMC (em cerca de 6,3-15,5%). Analisando a sensibilidade em paralelo temos 63,2% e uma especificidade de 79,3%, obtendo resultados bem similares a Santos (2012) e como um aumento de até 36,9% na sensibilidade da técnica. Ao utilizar o conjunto de critérios como padrão ouro, observamos um aumento de até 16,7% na sensibilidade da qPCR. Pode-se observar, também, que a amostra de urina, mesmo não sendo uma amostra muito pura e proveniente do sítio alvo da lesão, apresentou bom desempenho na qPCR, a qual é uma técnica sensível o suficiente para detectar até 3 bacilos, ou 15 fg de DNA, por mL de amostra (SANTOS, 2012). Cruz et al. (2011) relatam a possível hipótese que o *Mycobacterium tuberculosis* ou seus fragmentos sejam eventualmente excretados na urina e que seja prudente a coleta de pelo menos 3 amostras consecutivas ou mais amostras em 24 horas. O DNA presente na urina pode ser originário de: micobactéria circulante no sangue e filtrada na urina; presença de fragmentos da micobactéria; DNA livre ou micobactéria latente nos rins, que pode se tornar ativa após doença instalada nos pulmões. Além disso, os resultados falso-negativos encontrados nesse estudo podem ser devido à coleta de poucas amostras de cada paciente ou à distribuição não homogênea do bacilo na urina (CRUZ et al., 2011). Com a qPCR observou-se também uma concordância de pobre a moderada, mas com valores altamente significantes, onde também foi possível notar maior concordância quando analisou-se as amostras em paralelo ($k=0,434$).

Rozales (2013) comparou o desempenho de duas técnicas moleculares, a Nested PCR e a PCR em tempo real, no diagnóstico da tuberculose pulmonar. Para isso, utilizou 124 amostras pulmonares, sendo 57 lavados bronco-alveolares, 27 escarros induzidos e 40 escarros de expectoração espontânea. O estudo utilizou duas metodologias diferentes das utilizadas nesse trabalho para avaliação do mesmo alvo aqui proposto, e obteve resultados da NPCR de sensibilidade igual a 80% e especificidade de 99%. Por outro lado a qPCR apresentou valores de sensibilidade e especificidade de 90% e 97%, respectivamente, utilizando a cultura mais critérios clínicos como definição de caso. Os bons resultados apresentados por Rozales (2013) devem-se, provavelmente, ao uso de amostras obtidas diretamente do sítio da lesão:

todas as amostras foram de origem pulmonar, além disso, a maioria foi coletada de forma não espontânea. Ao comparar as duas técnicas, ambas apresentaram-se como potenciais auxiliadoras no diagnóstico e controle da doença, sendo que a qPCR é uma metodologia mais rápida (2 horas) e de menor custo (\$ 15.76/teste), além de ser uma metodologia quantitativa.

No presente estudo, todos os pacientes tiveram amostras pulmonares (escarro) e extrapulmonares (sangue e urina) coletadas, sendo que os mesmos eram sintomáticos respiratórios, possuindo dados clínicos compatíveis e alguns com foco pulmonar. As amostras de escarro foram coletadas espontaneamente, dificultando muitas vezes o seu processamento. Muitas vezes os pacientes não realizam a coleta de maneira adequada, obtendo-se uma amostra insuficiente em qualidade e quantidade, aumentando o número de falsos negativos, e assim levando a uma falsa avaliação do desempenho da técnica. Apesar do modo de coleta da amostra pulmonar poder interferir nos resultados das técnicas, optou-se pela coleta de amostras espontâneas, não invasivas e com maior aceitação de coleta pelos pacientes, quando comparados às metodologias de coleta de amostras pulmonares invasivas. Em relação aos falso positivos, pode-se citar as técnicas moleculares foram criadas para detecção específica do alvo estudado. Por vivermos em uma região altamente endêmica, além da existência de outras formas clínicas da doença com ou sem a presença de sintomas, além da pulmonar, pode-se observar a detecção do bacilo em algumas amostras biológicas, não necessariamente estando associada à tuberculose pulmonar. Além da ausência de sintomas em alguns pacientes, as técnicas convencionais também possuem falhas, sendo alguns casos não diagnosticados.

Ao comparar-se as duas técnicas, observou-se que ambas foram mais eficazes que a rotineira baciloscopia na detecção do bacilo causador de TB. A STNPCR apresentou menor sensibilidade que a qPCR, mas maior especificidade, indicando a capacidade excludente do teste. Apesar do valor de sensibilidade menor ($p < 0,001$), a STNPCR apresentou, além da maior especificidade ($p < 0,001$), maior valor preditivo positivo ($p < 0,001$), indicando uma real capacidade de detectar os positivos: dos poucos que foram detectados, pode-se dizer com 95% de certeza que realmente eram pertencentes ao grupo TB. A qPCR teve resultado de sensibilidade comparável à cultura de escarro, padrão-ouro ideal para o diagnóstico da doença, tornando-a superior como método diagnóstico da doença. Assim, temos propostas de duas metodologias rápidas e sensíveis que se complementam em termos de desempenho na detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em diferentes amostras biológicas em pacientes suspeitos

de TB pulmonar, principalmente quando se trata de pacientes paucibacilares e/ou de regiões consideradas endêmicas para a doença. Quando opta-se por uma varredura mais abrangente, com objetivo de triar os casos de TB, a qPCR torna-se a melhor opção. Entretanto quando o objetivo for excluir os não doentes e detectar mais corretamente os verdadeiros positivos, a STNPCR apresenta-se como melhor opção. Comparando-se as vantagens e desvantagens de cada técnica a qPCR apresentou melhores resultados de sensibilidade, indicando maior capacidade em detectar os casos da doença. Além disso, apresenta a vantagem de ser um teste ainda mais rápido, que dura cerca de 1 hora e 30 minutos, comparado às 4 horas da STNPCR, que além das 4 horas de corrida tem a necessidade de uma etapa pós-PCR (gel de agarose). A técnica de PCR em tempo real apresenta outra série de vantagens: a possibilidade de uma análise quantitativa da amostra ser realizada em tempo real; correlacionar o resultado quantitativo da carga bacteriana, com o estágio da doença, resposta terapêutica, e resistência a drogas; identificar e diferenciar as micobactérias não-tuberculosas; obter resultados mais rápido (GARBERI et al., 2011; PARASHAR et al., 2006; RICHARDSON; SAMSON; BANAEI, 2009). O custo da PCR na rotina é factível, considerando que o diagnóstico rápido permitiria instituir o tratamento específico o mais precocemente possível, diminuindo assim as fontes bacilíferas e, com elas, a infecção pelo *M. tuberculosis*, portanto reduzindo a cadeia de transmissão (ASSIS et al., 2007). A escolha de uma das metodologias para aplicação na rotina laboratorial deve envolver a análise criteriosa da estrutura do local onde será realizada, objetivos pretendidos, além das características aqui relatadas.

Amostras de sangue são frequentemente usadas em técnicas moleculares, mas o desempenho das mesmas pode ser reduzido frequentemente devido à presença de inibidores, principalmente o grupo heme nos eritrócitos (AL-SOUD WA; RÂDSTRÖM P, 2001). Por isso, optamos nesse estudo pelo descarte das hemácias, e pela utilização do plasma e PBMC separadamente, visando a redução dos inibidores naturalmente presentes. Amostras de escarro são naturalmente contaminadas, contendo diferentes espécies de microrganismos patógenos e comensais, sendo necessária uma purificação eficaz, bem como uma extração adequada do DNA para uma PCR eficaz (BROCCOLO et al., 2003). Amostras de urina possuem vários componentes, como sais, enzimas, e outras bactérias que também podem interferir no processo de purificação e extração do DNA, porém a sua utilização aumenta em 10% a sensibilidade da PCR (LIMA, 2009; REBOLLO et al., 2006). Diversos estudos destacam a importância da utilização de mais

de um tipo de amostra para aumentar a sensibilidade desta técnica e as chances diagnósticas de um paciente (BROCCOLO et al., 2003; CRUZ et al., 2011; LIMA, 2009; REBOLLO et al., 2006; SALAZAR, 2012; SANTOS, 2012). Pode-se comprovar que a utilização de diversas amostras de um mesmo paciente aumenta o desempenho de ambas as PCRs, ao analisar as sensibilidades e especificidades em paralelo conforme Medronho et al. (2002).

Estudos futuros são necessários para validação de ambas metodologias, que demonstraram ser complementares entre si, mas principalmente da PCR em tempo real, que apresentou uma sensibilidade significativamente melhor quando comparada à STNPCR ($p < 0,001$), com o objetivo de obter cada vez mais resultados fidedignos. Faz-se necessário avaliar e validar a técnica utilizando um maior número de pacientes positivos, controles negativos sem sintomas respiratórios e nenhuma patologia pulmonar, amostras e um controle interno, além de análises comparativas do método de purificação/descontaminação das diferentes amostras biológicas, testando uma técnica de descontaminação menos agressiva para as amostras paucibacilares, como a urina. Como perspectiva tem-se também a possibilidade do desenvolvimento de um sistema multiplex de PCR em tempo real capaz de identificar não só o alvo IS6110, como o controle interno, e também outras espécies, ao mesmo tempo.

Com esse estudo, pode-se demonstrar que a utilização de mais de um tipo de amostra melhora o desempenho das técnicas moleculares apresentadas, tanto da PCR em tempo real quanto da Nested PCR em único tubo. Além disso, a PCR em tempo real apresentou melhor sensibilidade, ou seja, capacidade em detectar o DNA do bacilo da tuberculose nas amostras analisadas. Isso a torna uma ferramenta importante para avaliar e definir melhor o diagnóstico da TB pulmonar, auxiliando sobretudo quando não se pode utilizar como padrão ouro apenas a cultura, situação bastante comum quando os estudos são feitos utilizando pacientes de regiões endêmicas para tuberculose e paucibacilares. Estes usualmente são provenientes das instituições do SUS, onde o diagnóstico de TB é feito praticamente utilizando o conjunto de critérios que envolve dados clínicos, epidemiológicos e resposta ao tratamento específico. Enquanto isso, a STNPCR apresentou melhor especificidade e valor preditivo positivo, demonstrando maior capacidade em detectar os não doentes e determinar verdadeiramente os casos positivos.

8 CONCLUSÕES

- a) Tanto a STNPCR quanto a qPCR foram eficazes na detecção do DNA do *Mycobacterium tuberculosis*, tendo um aumento do desempenho observado quando analisada mais um tipo de amostra biológica, em paralelo;
- b) A escolha de uma das duas metodologias molecular deve envolver uma análise criteriosa da rotina do laboratório, do perfil clínico do paciente e dos objetivos a serem alcançados, sendo que a qPCR seria a mais recomendada para o diagnóstico, por ter demonstrado ser mais rápida e sensível.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C.; WERKHÄUSER, R.; MELO, F. L. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. Biotechniques, Natick, v. 33, n. 6, p. 1210-1214, 2002.
- AL-SOUD, W. A.; RÂDSTRÖM, P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. J. Clin. Microbiol., Washington, DC, v. 39, n. 2, p. 485-493, 2001.
- ASSIS, N. C. S. et al. Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. J. Bras. Patol. Med. Lab., Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 1-7, fev. 2007.
- ASSIS, A. C. B.; SILVA, A. V.; SILVA, R. C.; LANGONI, H. Comparação da PCR, Baciloscopia e Cultura no diagnóstico da tuberculose humana. Vet. zootec., São Paulo, v. 18, n 3, p. 384-392, set. 2011.
- BARRETO, A. M. W. et al. Manual de Bacteriologia da tuberculose. 3. ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2005.
- BASS Jr., J. B. et al. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis., Baltimore, v. 142, n. 3, p. 725-735, 1990.
- BENTO, J. et al. Métodos diagnósticos em tuberculose. Acta. Med. Port., Lisboa, v. 24, n. 1, p. 145-154, 2011.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 44, 2013. Disponível em: <<http://www.vigilanciaemsaude.ba.gov.br/sites/default/files/Boletim-Tuberculose-2014.pdf>>. Acesso em: 4 jan. 2015.
- BOLLELA, V. R.; SATO, D. N.; FONSECA, B. A. L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose infantil. Rev. Saúde. Pública., São Paulo, v. 3, n. 3, p. 281-286, 1999.
- BOMBARDA S. et al. Imagem em tuberculose pulmonar. J. Pneumol., Brasília, v. 27, n. 6, p. 329-340, 2001.
- BRASIL. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Cadernos de atenção básica: Manual técnico para o controle da tuberculose. Brasília, 2002. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caderno_atencao_basica.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2014.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Recomendações para o Controle da tuberculose no Brasil. Bras2011. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/TB/mat_tec/manuais/MS11_Manual_Recom.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2015.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias. 3. ed. Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica: Dados. Brasília, DF, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/741-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/tuberculose/11485-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 4 jan. 2015.

BRASIL terá teste rápido para detectar a tuberculose. ÉPOCA, São Paulo, 24 mar. 2014. Disponível em: <<http://epoca.globo.com/vida/vida-util/saude-e-bem-estar/noticia/2014/03/brasil-tera-bteste-rapidob-para-detectar-btuberculoseb.html>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

BRATS: Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Brasília, DF: ANVISA, ano 6, n. 16, set. 2011. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/brats_16.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2014.

BROCCOLO, F. et al. Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantification of *Mycobacterium tuberculosis* load by two Real-time calibrated PRC assays. J. Clin. Microbiol., Washington, v. 41, n. 10, p. 4565-4572, 2003.

CAMPOS, H.S. Diagnóstico da Tuberculose. Pulmão. RJ., Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 92-99, 2006.

CAMPOS, H.S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. Pulmão. RJ., Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 29-35, 2006.

CAMPOS, H.S. Tratamento da Tuberculose. Pulmão. RJ., Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 21-31, 2007.

CANTALICE FILHO, J. P., SANT'ANNA C. C., BÓIA M. N. Aspectos clínicos da tuberculose pulmonar em idosos atendidos em hospital universitário do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. J. Bras. Pneumol., Brasília, v. 33, n. 6, p. 699-706, 2007.

CAPONE, D. et al. Diagnóstico por imagem da tuberculose pulmonar. Pulmão. RJ., Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 166-174, 2006.

CASSIANO, J. G. M. Tuberculose pulmonar e o uso de drogas ilícitas: entre o abandono e a cura. 2014. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde da Família) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

CHAN, et al. Single-tube nested PCR in the diagnosis of tuberculosis. J. Clin. Pathol., London, v. 49, p. 290-294, 1996.

COROS, A.; DECONNO E.; DERBYSHIRE K. M. IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of Lateral Gene Transfer among mycobacterial species. J. Bacteriol., Washington, v. 190, n. 9, p. 3408-3410, may 2008.

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.

CRUZ, V. D. et al. Consumo de Crack e a tuberculose: uma revisão integrativa. Rev. Eletrônica. Saúde. Mental. Álcool. Drog., Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 48-55, jan./abr. 2013.

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

FARAH, S. B. Métodos de análise dos ácidos nucleicos. In: _____. DNA: Segredos e Mistérios. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2007. cap. 4, p. 114-127.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

FOUNDATION FOR INNOVATIVE NEW DIAGNOSTICS. Frequently Asked Questions on Xpert MTB/RIF assay. Geneva, 2011. Disponível em: <http://www.finddiagnostics.org/export/sites/default/media/press/pdf/Xpert_FAQs.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2015.

FOUNDATION FOR INNOVATIVE NEW DIAGNOSTICS. FIND negotiated prices for Xpert® MTB/RIF and Country list. Geneva, 2011. Disponível em: <http://www.finddiagnostics.org/about/what_we_do/successes/find-negotiated-prices/xpert_mtb_rif.html>. Acesso em 15 fev. 2015.

FRANCISCHINI, C. W.; SUMITA, D. R.; WHITTLE, M. R. Development and use of triplex real-time PCR assay for human DNA quantification in forensic samples. Saúde, ética & justiça, São Paulo, v. 18, p. 72-78, 2013.

FURINI, A. A. C. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by nested polymerase chain reaction in pulmonary and extrapulmonary specimens. J. bras. pneumol., Brasília, v. 39, n. 6, p. 711-718, nov./dez. 2013.

GARBERI, J. et al. Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* using molecular biology technology. Asian Pac. J. Trop. Biomed., Beijing, v. 11, p. 89-93, 2011.

GILL, M. K.; KUKREJA, S.; CHHABRA, N. Evaluation of Nested Polymerase Chain Reaction for rapid diagnosis of clinically suspected tuberculous pleurisy. J. Clin. Diag. Res., v. 7, n. 11, p. 2456-2458, nov 2013.

GOMES, A. L. V. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers for the identification of dengue virus serotypes, J. Virol. Methods., Amsterdam, v 145, n. 1, p. 76-79, oct. 2007.

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

HAJIABDOLBAGHI et al. Application of peripheral blood *Mycobacterium tuberculosis* PCR for diagnosis of tuberculosis patients. Eur. rev. med. pharmacol. sci., Roma, v. 18, p. 185-189, 2014.

-
- HELLYER, T. J. et al. Strand displacement amplification and the polymerase chain reaction for monitoring response to treatment in patients with pulmonary tuberculosis. J. Infect. Dis., Chicago, v. 173, p. 934-941, 1996.
- HIJJAR, M. A. et al. Epidemiologia da tuberculose: importância no mundo, no Brasil e no Rio de Janeiro. Pulmão. RJ., Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p. 310-314, 2005.
- HILLEMANN, D. et al. Rapid Molecular Detection of Extrapulmonary Tuberculosis by the Automated GeneXpert MTB/RIF System. J. Clin. Microbiol., Washington, v. 49, n. 4, p. 1202-1205, apr. 2011.
- HUF, G.; KRITSKI, A. Avaliação da utilidade clínica de novos testes diagnósticos em tuberculose: o papel dos ensaios clínicos pragmáticos. J. Bras. Pneumol., Brasília, v. 38, n. 2, p. 237-245, fev. 2012.
- JOU, N. et al. Single-Tube, Nested, Reverse Transcriptase PCR for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol., Washington, v. 35, n. 5, p. 1161-1165, may 1997.
- KONEMAN, E. W. et al. Micobactérias. In: _____. Diagnóstico Microbiológico. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 904-916.
- LI, L. et al. Sputum *Mycobacterium tuberculosis* mRNA as a marker of bacteriologic clearance in response to antituberculosis therapy J. Clin. Microbiol., Brasília, v. 48, n. 1, p. 46-51, jan. 2010.
- 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, p. 690-697, jul. 2009.
- LIMA, J. F. C. Detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de sangue e urina através da Nested-PCR em único tubo. 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.
- LIRA, L. A. S. Avaliação do desempenho da técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.
- LIRA, L.A.S et al. Evaluation of a IS6110-Taqman real-time PCR assay to detect *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples of patients with pulmonary TB. J. Appl. Microbiol., Oxford, p. 1-6, dez. 2012.
- LUTZ, et al. Padronização das técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real para diagnóstico de *Candida albicans*. Rev. Jovens. Pesq., Santa Cruz do Sul, v. 3, n. 1, p. 51-66, 2013.
- MACIEL, E. L. N. et al. Avaliação de um sistema de pontuação para o diagnóstico da tuberculose na infância preconizado pelo Ministério da Saúde, Brasil. Cad. Saúde. Pública., Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 402-408, fev. 2008.

MARQUES, C.D.L. et al. Abordagem diagnóstica da tuberculose latente na artrite reumatóide. Rev Bras Reumatol, Campinas, v. 47, n.6, p. 424-430, nov./dez. 2007.

MDIVANI N. et al. Monitoring therapeutic efficacy by Real-Time detection of *Mycobacterium tuberculosis* mRNA in sputum. Clin. Chem., New York, v. 55, n. 9, p. 1694-1700, 2009.

MEDRONHO, R. A. et al. Epidemiologia. São Paulo: Atheneu, 2002.

MELO, F. L. Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em PCR para a detecção de Schistosoma mansoni. 2006. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

MENDES, A. M.; FENSTERSEIFER, L. M. Tuberculose: porque os pacientes abandonam o tratamento? Bol. Pneumo. Sanit., São Paulo, v. 12, n. 1, p. 25-36, 2004.

MONTEIRO, J et al.. Rapid detection of cabapenemase genes by multiplex real-time PCR. J. Antimicrob. Chemother., London, v. 67, n. 4, p. 906-909, jan 2012.

MONTENEGRO, L. M. L. et al. The Performance of an in-house nested-PCR technique for pleural tuberculosis diagnoses. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Brasília, v 46, n. 5, p. 594-599, set./out. 2013.

MORRONE, N. et al.. Pneumopatia causada por *Mycobacterium kansasii*. J. Pneumol., Brasília, v. 29, n. 6, p. 341-349, nov./dez. 2003.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. Rev. Bras. Med., v. 67, supl. 10, nov. 2010.

NATAL, S. Tuberculose na criança. Boletim de Pneumologia Sanitária, Rio de Janeiro, v. 8, n. 2, p. 21-25, dez. 2000.

NOVAIS, C. M.; ALVES-PIRES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. Rev. Biotec. Ciência Desenvol., Brasília, v. 33, p. 10-13, 2004.

OPAS – Organização Pan-americana de Saúde. Métodos de investigação epidemiológica em doenças transmissíveis. Disponível em: <<https://posstrictosensu.iptsp.ufg.br/up/59/o/MethodosdeInvestigacaoEpidemiologica-SegundaEd.pdf>>. Acesso em: 26 mar. 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. The Stop TB strategy: Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals. Geneva, 2006. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_HTM_STB_2006.368_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 12 fev. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global tuberculosis report 2013. Geneva, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html>. Acesso em: 1 fev. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global tuberculosis report 2014. Geneva, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: 4 jan. 2015.

PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. Immunology, Pathogenesis, Virulence. In: _____. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care. [S.I.]: Amedeo Challenge, 2007. cap 5, p. 163-170.

PARASHAR, D. et al. Applications of real time PCR technology to mycobacterial research, Indian. J. Med. Res., New Deli, v. 124, n. 1, p. 385-398, 2006.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Sanar intensificará ações no Recife e em Jaboatão. Recife, 2013. Disponível em: <<http://portal.saude.pe.gov.br/noticias/sanar-intensificara-acoes-no-recife-e-em-jaboatao/>>. Acesso em: 13 fev. 2014.

PIATEKA, 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.

PONTES, N. E. et al. Development and evaluation of single-tube nested PCR (STNPCR) for the detection of Porcine Circovirus type 2 (PCV2). Transboundary. and Emerging. Diseases., New Jersey, v. 61, n 3, p. 233-238, jun. 2014.

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.

RICHARDSON, E. T; SAMSON, D; BANAEI, N. Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria by Multiplex, Real-Time PCR. J. clin. microbiol., Washington, v. 47, n. 5, p. 1497-1502, 2009.

ROSEMBERG, J. Tuberculose: aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. Bol. Pneumol. Sanit., Rio de Janeiro, v. 7, n. 2, jul./dez. 1999.

ROZALES, F. P. et al. PCR to detect *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory tract samples: evaluation of clinical data. Epidemiol. Infect., Cambridge, set. 2013.

ROZALES, F. P. Real-time PCR e NESTED-PCR no diagnóstico da tuberculose pulmonar. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Brasília, v. 35, n. 1, p. 51-58, jan./fev. 2002.

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, F. C. F. Avaliação do desempenho da técnica em PCR em tempo real em diferentes amostras biológicas utilizadas para o diagnóstico da tuberculose

extrapulmonar. 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

SANTO, S. A. P. T. Padronização da PCR em tempo real para o diagnóstico da Hepatite B. 2014. Mestrado (Mestrado em Ciências) – Secretaria de Saúde, São Paulo, 2014.

SHAMPO, M. A.; ROSENOW, III E. C. A history of tuberculosis on stamps. Chest, Park Ridge, v. 136, p. 578-582, aug. 2009.

SILVA, M. A. L. et al. Optimization of single-tube nested PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Exp. parasitol., New York, v. 134, n. 2, p. 206-210, jun. 2013.

TARANTINO, A. B. Tuberculose. In _____. Doenças Pulmonares. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 17, p. 266-330.

TESTE rápido para diagnosticar tuberculose será oferecido pelo SUS. Portal Brasil, Brasília, DF, 25 mar. 2013. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/saude/2013/03/teste-rapido-para-diagnosticar-tuberculose-sera-oferecido-no-sus>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

VENDRAMINI, F. H., et al. Tuberculose em município de porte médio do sudeste do Brasil: indicadores de morbidade e mortalidade, de 1985 a 2003. J. bras. pneumol., Brasília, v. 31, n. 3, p. 237-243, 2005.

WANG, X.; SEED, B. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. Nucleic acids res., London, v. 31, n. 24, p. 1-8, 2003.

WATSON, J. D. et al. Técnicas de Biologia Molecular. In: _____. Biologia molecular do gene. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 658.

WEYER, K. et al. Rapid molecular TB diagnosis: evidence, policy making and global implementation of Xpert MTB/RIF. Eur Respir J, Copenhagen, v. 42, p. 252-271, 2013.

WILDNER, L. M. et al. Micobactérias: Epidemiologia e diagnóstico. Rev. Patol. Trop., Goiania, v. 40, n. 3, p. 207-229, jul./set. 2011.

WU, Y. Y.; CSAKO, G. Rapid and/or high-throughput genotyping for human red blood cell, platelet and leukocyte antigens, and forensic applications. Clin. Chim. Acta., Amsterdam, v. 363, p. 165-176, 2006.

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



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

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

TERMO DE CONSENTIMENTO

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a), da pesquisa - "DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ABORDAGENS MOLECULARES E IMUNOLÓGICAS PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE", após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:

Título do Projeto: Desenvolvimento e Validação de abordagens moleculares e imunológicas para o diagnóstico da tuberculose.

Pesquisador (a) Responsável: Dra Haiana Charifker Schindler

Telefones para contato: (81) 2101-2560 ou 2101-2569

Pesquisadores Participantes: Lílian Maria Lapa Montenegro, Rosana de Albuquerque Montenegro, Juliana Figueirêdo da Costa Lima, Andrea Santos Lima, Klarissa Miranda Guarines, Aline dos Santos Peixoto, Fabiana Cristina Fulco Santos, Laís Ariane de Siqueira Lira, André Luiz Alves do Nascimento.

Objetivos: O objetivo da nossa pesquisa é desenvolver um método molecular para o diagnóstico de tuberculose pulmonar, extrapulmonar e monitoramento terapêutico.

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

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

Para a nossa pesquisa coletaremos 10ml de sangue, 30ml de urina e 1-5ml de escarro serão encaminhadas ao laboratório de Imunoepidemiologia do departamento de Imunologia do CPqAM para ser submetida a técnica de PCR por profissionais capacitados. Os resultados de todos os exames serão encaminhados ao médico responsável pelo atendimento. As amostras serão congeladas e armazenadas para uso futuro caso seja necessário.

Riscos e Benefícios: O Sr(a) não será submetido a qualquer risco ou desconforto adicional e seguiremos a rotina estabelecida pelo profissional de saúde, seja a nível ambulatorial ou enfermaria. O benefício deste estudo será contribuir para o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, específicas, rápidas e menos dolorosas que possam ser adequadas à realidade do nosso sistema público de saúde, e a padronização de critérios mais eficazes que irão beneficiar o diagnóstico precoce da tuberculose pleural.



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

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

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

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia
Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária.
Campus da UFPE.

Fone: (81) 2101-2569

Contato: Lílian Maria Lapa Montenegro, Dra. Haiana Charifker Schindler, Rosana de Albuquerque Montenegro, Juliana Figueirêdo da Costa Lima, Andrea Santos Lima.

CONSENTIMENTO

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

Nome do Paciente: _____

Assinatura do paciente ou do responsável

Assinatura do médico/pesquisador

_____, ____/____/____.

APÊNDICE B – Ficha clínica-epidemiológica

PROTOCOLO DE PESQUISA DE TUBERCULOSE

IDENTIFICAÇÃO		
1. Número da ficha na pesquisa <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		2. Data da entrevista ____/____/____
3. Procedência: 1. Ambulatório <input type="checkbox"/> 2. Enfermaria <input type="checkbox"/>		4. Número do Prontuário do Hospital <input type="text"/> <input type="text"/>
5. Hospital de origem: 1. Hospital das Clínicas <input type="checkbox"/> 2. Hospital Otávio de Freitas 3. IMIP 4. Hospital Barão de Lucena 5. Outro: _____		6. Número do SAME <input type="text"/> <input type="text"/>
DADOS DO PACIENTE		
7. Nome Completo do Paciente _____		
8. Nome da Mãe ou Responsável _____		
9. Data de nascimento ____/____/____	10. Idade do paciente <input type="text"/> <input type="text"/> anos <input type="text"/> <input type="text"/> meses	11. Sexo 1. Feminino <input type="checkbox"/> 2. Masculino <input type="checkbox"/>
12. Endereço _____ _____ Ponto de referência _____		
13. Bairro _____	14. Cidade _____	15. UF <input type="text"/> <input type="text"/>
16. Telefone Res. e Celular (____) _____ - _____ (____) _____ - _____	17. CEP _____	18. Zona de localização da moradia 1. Urbana <input type="checkbox"/> 2. Rural <input type="checkbox"/>
DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS		
19. Grau de instrução do paciente 1. Analfabeto 2. Iniciou alfabetização <input type="checkbox"/> 3. 1º grau 4. 2º grau 5. 3º grau 6. Outro		20. Renda familiar mensal 1. Menor ou igual a 1 salário mínimo 2. De 2 a 4 salários mínimos 3. Mais que 5 salários mínimos 4. Biscate 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>

21. Quantas pessoas moram na casa do paciente? 1. Até 3 <input type="checkbox"/> 2. De 4 a 6 3. Mais de 6 8. Não sabe informar	22. Quantos adultos? 1. Até 2 <input type="checkbox"/> 2. De 3 a 5 3. Mais que 5	23. Quantas crianças? 1. Até 2 <input type="checkbox"/> 2. De 3 a 5 3. Mais que 5	24. Quantos cômodos (locais de dormir) têm na casa? 1. Um <input type="checkbox"/> 2. De 2 a 4 3. Mais de 4 8. Não sabe informar
25. Existe alguém da família ou do convívio que faz tratamento prolongado para TB? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 3. Sim -não sabe informar a doença 8. Não sabe informar			
DADOS EPIDEMIOLÓGICOS			
26. Existe algum caso de tuberculose na família ou em pessoa de convívio? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar 37. Caso sim, há quanto tempo? _____ Caso a resposta seja Não, seguir para 35	28. O caso foi confirmado? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar 9. Inaplicável Caso a resposta seja Não, pular para 30		
29. O caso foi confirmado por baciloscopia e/ou cultura? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	30. Qual o grau de parentesco? 1. Mãe <input type="checkbox"/> 2. Pai 3. Irmã (o) 4. Avô (ó) 5. Tio (a) 6. Primo (a) 7. Outro 8. Não sabe informar 9. Inaplicável Outro: _____		
31. Período de duração do contato: 1. < 3 meses <input type="checkbox"/> 2. 3 meses a 2 anos 3. + que 2 anos 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	32. 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		
33. Em relação ao tratamento para TB o contato: 1. Foi tratado totalmente 2. Está em tratamento 3. Não tratado 4. Interrompeu o tratamento <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 9. Inaplicável Caso não tenha havido interrupção, seguir para 39.	34. Qual o motivo da interrupção: 1. Intolerância ao medicamento 2. Falta de medicamento 3. Abandono do tratamento 4. Outro motivo <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 9. Inaplicável		
ANTECEDENTES DO PACIENTE			
35. Já teve alguma doença? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar Caso a resposta seja Não, seguir para 37.	36. Qual doença? 1. Asma <input type="checkbox"/> 2. Pneumonia 3. Bronquite 4. Tuberculose 5. Diabetes 6. Fibrose Cística 7. HIV/AIDS 8. Câncer 9. Não sabe 10. Outro: _____		

37. Tem cicatriz de BCG? (vista pelo entrevistador no braço direito ou através de cartão) 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não verificado <input type="checkbox"/>		
38. Fez PPD anterior? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/> Data de realização: ____/____/____ (Vê no cartão) Caso não tenha feito, seguir para 40.	39. Resultado do PPD: 1. Não reator (0-4mm) <input type="checkbox"/> 4. Reator muito forte (>15mm) <input type="checkbox"/> 2. Reator fraco (5-9mm) <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 3. Reator forte (10-14mm) <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	
40. Toma algum medicamento atualmente? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Qual: _____	41. Já fez TTO para tuberculose? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Qual: _____ Caso sim, quanto tempo? _____ Caso sim, número de TTO anteriores: _____	
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (referidos pelo Informante)		
42. Há quanto tempo o paciente está doente? ____ meses ____ dias	43. Tem febre? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/> Caso sim, há quanto tempo: _____	44. Perda de peso? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>
45. Tem tosse? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/> Caso sim, há quanto tempo: _____	46. Tipo de tosse: 1. Seca <input type="checkbox"/> 2. Produtiva <input type="checkbox"/> 3. Hemoptise <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	47. Tem falta de apetite? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>
48. Tem fraqueza muscular? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>	49. Apresenta falta de ar desde que ficou doente? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>	50. Tem dor nas juntas? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/> Caso não, seguir para 52.
51. Qual o local? 1. Joelho <input type="checkbox"/> 2. Cotovelo <input type="checkbox"/> 3. Punho <input type="checkbox"/> 4. Coluna <input type="checkbox"/>	52. Apresenta dor na barriga? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>	53. Notou aumento da barriga? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>
54. Notou linfonodo (lândria ou íngua) aumentado? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>	55. Local do linfonodo: 1. Pescoço <input type="checkbox"/> 2. Axila <input type="checkbox"/> 3. Região inguinal (virilha) <input type="checkbox"/> Outros _____	56. Apresenta suor noturno? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>
INVESTIGAÇÃO CLÍNICA (preenchida pelo médico acompanhante)		
Médico Responsável: _____		Fone: _____

65. Peso _____ Kg		66. Estatura _____ m	
EXAMES LABORATORIAIS (preenchido pelo médico pesquisador)			
57. Realizou hemograma? 1. Sim 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 2. Não 9. Inaplicável Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 110		58. Resultado da Hemoglobina _____ . _____ (g/dL)	
60. Caso sim: 1. Características de Infecção viral 2. Características de infecção bacteriana 3. Não sabe		59. Alteração do leucograma 1. Sim 2. Não 3. Não sabe	
62. Realizou Raio X de Tórax na admissão? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 64		61. Valor do VSH _____ mm	
64. Realizou Raio X de tórax de controle? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 114		63. Resultado do Raio X de admissão: 1. Normal 2. Alterado _____ - Se alterado: <input type="checkbox"/> 1. Padrão não sugestivo de TB 2. Forma Pneumônica 3. Forma Pneumoganglionar 4. Forma Pleuropulmonar 5. Forma Miliar 6. Forma Ganglionar 7. Inaplicável 8. Não sabe informar	
66. Realizou Tomografia de tórax? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 68.		65. Resultado do Raio X de controle: 1. Normalizou <input type="checkbox"/> 2. Houve melhora 3. Houve piora 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	
68. Realizou PPD para pesquisa? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 70.		67. Resultado da Tomografia de tórax: 1. Normal <input type="checkbox"/> 2. Alterado sugestivo 3. Alterado inespecífico 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	
		69. Resultado do PPD: 1. Não reator (0-4mm) 4. Reator muito forte (>15mm) 2. Reator fraco (5-9mm) 8. Não sabe informar 3. Reator forte (10-14mm) 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	

70. Realizou Baciloscopia? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 73.	71. Resultado da baciloscopia: 1. Positiva <input type="checkbox"/> 2. Negativa <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> _____ Cruzes	72. Material da baciloscopia: 1. Escarro <input type="checkbox"/> 2. Lavado gástrico <input type="checkbox"/> 3. Líquor <input type="checkbox"/> 4. Biópsia <input type="checkbox"/> 5. Outro material <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> Outro _____
73. Realizou Cultura em meio Löwenstein-Jensen? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 76.	74. Resultado da Cultura: 1. Positiva <input type="checkbox"/> 2. Negativa <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	75. Material da Cultura: 1. Escarro <input type="checkbox"/> 2. Sangue <input type="checkbox"/> 3. Urina <input type="checkbox"/> 4. Lavado gástrico <input type="checkbox"/> 5. Líquor <input type="checkbox"/> 6. Biópsia <input type="checkbox"/> 7. Outro material <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> Outro _____
76. Diagnóstico inicial 1. TB infecção <input type="checkbox"/> 2. TB doença <input type="checkbox"/> 3. TB suspeita <input type="checkbox"/> 4. Não é TB <input type="checkbox"/>	77. Data da notificação: Data: ____/____/____ Profissional que notificou: _____	Se Extra pulmonar: 1. Ganglionar Periférica <input type="checkbox"/> 2. Ganglionar Pulmonar <input type="checkbox"/> 3. Meningocefálica <input type="checkbox"/> 4. Miliar <input type="checkbox"/> 5. Ossea <input type="checkbox"/> 6. Pleural <input type="checkbox"/> 7. Outra <input type="checkbox"/> 8. Inaplicável <input type="checkbox"/>
78. Diagnóstico Final 1. TB infecção <input type="checkbox"/> 2. TB doença <input type="checkbox"/> 3. TB suspeita <input type="checkbox"/> 4. Não é TB <input type="checkbox"/>	79. Forma de TB 1. Pulmonar <input type="checkbox"/> 2. Extra pulmonar <input type="checkbox"/>	
80. Tratamento realizado: 1. Profilaxia primária (INH por 3 meses) <input type="checkbox"/> 2. Profilaxia secundária (INH por 6 meses) <input type="checkbox"/> 3. Esquema I (INH + RMP por 6 meses e PZA por 2 meses) - Tradicional <input type="checkbox"/> 4. Esquema IR (INH + RMP + BEM por 6 meses e PZA por 2 meses) <input type="checkbox"/> 5. Esquema II (INH + RMP por 9 meses e PZA por 2 meses) <input type="checkbox"/> 6. Esquema III (SM + PZA por 3 meses e ETH + EM por 12 meses) <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	81. Data do início do tratamento: ____/____/____	
82. Tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico de TB: 1. ≤ 1 mês <input type="checkbox"/> 2. 1 - 3 meses <input type="checkbox"/> 3. ≥ 3 meses <input type="checkbox"/> 4. Não investigado <input type="checkbox"/>	83. Tempo entre o diagnóstico de TB e início do tratamento específico: 1. ≤ 1 mês <input type="checkbox"/> 2. 1 - 3 meses <input type="checkbox"/> 3. ≥ 3 meses <input type="checkbox"/> 4. Não investigado <input type="checkbox"/>	
EVOLUÇÃO		
84. Resposta ao tratamento específico (feita pelo médico acompanhante) 1. Melhora clínica evidente após 30 dias de início do tratamento (Resposta ao tratamento) <input type="checkbox"/> 2. Não houve melhora clínica evidente após 30 dias de início do tratamento (Não houve resposta ao tratamento) <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>		

Entrevistador: _____	Assinatura: _____
----------------------	-------------------

DIAGNÓSTICO MOLECULAR		
88. Realizou Nested-PCR Único Tubo pré-tratamento? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: __/__/____	89. Resultado 1. Positivo <input type="checkbox"/> 2. Negativo <input type="checkbox"/> 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	90. Amostra biológica: 1. <input type="checkbox"/> Sangue total 6. <input type="checkbox"/> Liq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas 8. <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro 9. <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico 99. <input type="checkbox"/> Não se aplica
91. Realizou PCR colorimétrica pré-tratamento? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: __/__/____	92. Resultado 1. Positivo <input type="checkbox"/> 2. Negativo <input type="checkbox"/> 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	93. Amostra biológica: 1. <input type="checkbox"/> Sangue total 6. <input type="checkbox"/> Liq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas 8. <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro 9. <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico 99. <input type="checkbox"/> Não se aplica
94. Realizou RT-PCR pré-tratamento? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: __/__/____	95. Resultado 1. Positivo <input type="checkbox"/> 2. Negativo <input type="checkbox"/> 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	96. Amostra biológica: 1. <input type="checkbox"/> Sangue total 6. <input type="checkbox"/> Liq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas 8. <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro 9. <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico 99. <input type="checkbox"/> Não se aplica

Responsável pelo preenchimento da ficha: _____

Telefone para contato: _____

Responsável pelos exames moleculares: _____

ANEXO A – Parecer de aprovação do comitê de ética do CPqAMComitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: "Avaliação de duas técnicas de reação em cadeia da polimerase na detecção do Mycobacterium tuberculosis em diferentes amostras biológicas".

Pesquisador responsável: Klarissa Miranda Guarines

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 17/04/2013

Registro no CAAE: 30444114.7.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 743.874

PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 06 de agosto de 2017.

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

Recife, 14 de agosto de 2014.

Vice-Coordenador do CEP/CPqAM

Paul Hindenburg Nobre de V. Siiv.:
Analista de Gestão em Saúde
Vice-Coordenador
Mat. SIAPE 1556806
CEP/CPqAM/Fiocruz