

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Aggeu Magalhães

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE

Danyelee Costa de Mello

**Desenvolvimento de um kit baseado em amplificação isotérmica de DNA  
mediada por loop (LAMP-PCR) em único tubo para o diagnóstico da  
tuberculose pulmonar**

Recife

2022

Danyele Costa de Mello

**Desenvolvimento de um kit baseado em amplificação isotérmica de DNA  
mediada por loop (LAMP-PCR) em único tubo para o diagnóstico da  
tuberculose pulmonar**

Dissertação de Mestrado Acadêmico em  
Biotecnologia e Biotecnologia em saúde  
apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Saúde Pública do Instituto  
Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo  
Cruz, como requisito para obtenção do  
grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dra. Haiana Charifker Schindler  
Coorientadora: Dra. Rosana De Albuquerque Montenegro

Recife  
2022

Título do trabalho em inglês: Development of a single-tube isothermal DNA amplification (LAMP-PCR) based kit for the diagnosis of pulmonary tuberculosis.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) - Código de Financiamento 001.

M527d Mello, Danyele Costa de.  
Desenvolvimento de um kit baseado em amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP-PCR) em único tubo para o diagnóstico da tuberculose pulmonar / Danyele Costa de Mello. -- 2022.  
75 p. : il.color.

Orientadora: Haiana Charifker Schindler.  
Coorientadora: Rosana de Albuquerque Montenegro.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2022.  
Bibliografia: f. 55-60.

1. Tuberculose - diagnóstico. 2. Kit de reagentes para diagnóstico. 3. Mycobacterium tuberculosis. I. Título.

CDU 616-002.5

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239  
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

Danyele Costa de Mello

**Desenvolvimento de um kit baseado em amplificação isotérmica de DNA  
mediada por loop (LAMP-PCR) em único tubo para o diagnóstico da  
tuberculose pulmonar**

Dissertação de Mestrado Acadêmico  
apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Biociências e  
Biotecnologia em Saúde do Instituto  
Aggeu Magalhães, Fundação  
Oswaldo Cruz, como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências.

Aprovada em: 14 de outubro de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Haiana Charifker Schindler

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr. Fábio Lopes Melo

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dra. Juliana Figuerêdo da Costa Lima Suassuna Monteiro

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Aos pacientes  
e à todos que  
fizeram parte  
desse estudo,  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, a minha fé e a minha espiritualidade por todo apoio e auxílio nas tomadas de decisões que me fizeram chegar até aqui.

Aos meus pais, Fabrícia e Romero e ao meu irmão Yago, por terem sido responsáveis pela minha educação, terem me incentivado e me ensinado o melhor caminho a ser seguido. Nada teria sido possível sem eles. Muito obrigada por todo o suporte de sempre e por terem sido peça fundamental para formar quem eu sou hoje. Amo vocês.

À minha orientadora, Dra. Haiana Schindler pela oportunidade de ser sua aluna desde 2017, por depositar sua confiança em mim e acreditar no meu potencial como profissional. Agradeço por toda paciência e todo carinho que sempre teve comigo.

À minha coorientadora, Dra Rosana, por toda paciência em me ajudar no decorrer de todos esses anos, pela motivação e incentivo quando eu me preocupei com a dissertação. Muito obrigada pela sua atenção, as nossas conversas, tudo foi essencial.

Às minhas amigas que estão comigo desde a época da escola que presenciaram toda a minha jornada e sempre me dão suporte quando eu preciso, as quais não posso jamais deixar de citar: Amanda, Gabriela e Nayana. Agradeço imensamente por todo amor, carinho e atenção que sempre tiveram comigo. Obrigada por todos os momentos felizes e pelos momentos difíceis que superamos juntas. Amo vocês.

Aos meus amigos da Fiocruz: João Paulo, Igor, Luanna, Romário e Laryssa, Giovanna, Rayssa etc., muito obrigada por todos os momentos que compartilhamos juntos. Agradeço imensamente por me deixarem fazer parte da vida de cada um de vocês, por todas as conversas, por todos os desabafos, por todos os choros e também muitos momentos felizes. Sem vocês no meu dia a dia, seria impossível chegar até aqui. Espero que possamos vivenciar muitos momentos felizes nessa vida ainda. Amo vocês.

Ao Instituto Aggeu Magalhães por ter sido minha casa nesses últimos anos para concluir os estudos que desenvolvi lá dentro.

Aos órgãos de fomento que financiaram o estudo.

Agradeço a todas as pessoas que torceram e torcem por mim e que, de certa

forma, também me ajudaram e me deram suporte para chegar aonde eu cheguei.

## RESUMO

MELLO, Danyele Costa de. Desenvolvimento de um kit baseado em amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP-PCR) em único tubo para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. 2022. Dissertação (Mestrado em Biocências e Biotecnologia em Saúde) — Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), que afeta principalmente os pulmões, porém, pode acometer outros órgãos. A detecção precoce de um indivíduo com TB é fundamental e, diante desse cenário, ensaios moleculares baseados em PCR estão entre os mais promissores métodos de diagnósticos quando comparados aos utilizados na rotina (baciloscopia e cultura). A amplificação isotérmica de DNA mediada por Loop (LAMP) vem ganhando espaço nos estudos envolvendo diagnóstico de doenças infecciosas por possuir diversas vantagens. Consiste, basicamente, na amplificação e detecção isotérmica de fragmentos contendo o DNA alvo utilizando seis oligonucleotídeos diferentes, especialmente desenhados para amplificar oito regiões no gene de interesse. O presente estudo pretende desenvolver um protótipo de kit baseado na amplificação isotérmica de DNA mediada por Loop (LAMP) em único tubo eficiente na identificação da TB pulmonar, sendo produzido no Brasil. Para a avaliação do limite de detecção do kit, foi feita uma curva de diluição, inicialmente em água *MilliQ*, em seguida, em escarro. Ambas as curvas foram de fator 10, variando de 100pg/μL à 100ag/μL de DNA do *Mtb* da cepa de referência H37Rv. Os reagentes do LAMP passaram por um controle de qualidade com a finalidade de avaliar sua durabilidade e estabilidade, durante 3 meses, em uma temperatura semelhante a de geladeira (4°C). O kit foi testado em amostra biológica de escarro de pacientes diagnosticados com tuberculose (Grupo TB) e pacientes portadores de qualquer outra doença (Grupo não TB) para avaliação de sensibilidade e especificidade. O limite de detecção em água *MilliQ* e em amostra de escarro sabidamente negativa foi de 1fg/uL e o kit se manteve estável durante os 3 meses na temperatura de 4°C. Com relação ao desempenho do kit, foram obtidos valores de sensibilidade e especificidade, 98,28% e 95,56%, respectivamente. Devido a sua elevada sensibilidade juntamente ao bom limite de detecção obtido, o desenvolvimento de um protótipo de kit, com grande valor de diagnóstico, permitirá trazer a possibilidade de uma identificação do bacilo mais rápida e eficaz que contribuirá em uma maior descoberta de casos e no auxílio aos métodos tradicionais para confirmação da doença.

Palavras-chave: tuberculose; diagnóstico; LAMP



## ABSTRACT

MELLO, Danyele Costa de. Development of a single-tube isothermal DNA amplification (LAMP-PCR) based kit for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. 2022. Dissertation (Master's in Biosciences and Biotechnology in Health) — Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), which mainly affects the lungs, however, it can affect other organs. The early detection of an individual with TB is essential and, given this scenario, molecular assays based on PCR are among the most promising diagnostic methods when compared to those used routinely. Loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP) has been gaining ground in studies involving the diagnosis of infectious diseases because it has several advantages. It basically consists of the isothermal amplification and detection of fragments containing the target DNA using six different oligonucleotides, specially designed to amplify eight regions in the gene of interest. The present study intends to develop a prototype of a kit based on isothermal amplification of DNA mediated by Loop (LAMP) in a single tube efficient in the identification of the several clinical forms of the disease, being produced in Brazil. For the evaluation of the detection limit of the kit, a dilution curve was made, initially in MilliQ water and then in sputum. Both curves were factor 10, ranging from 100pg/ $\mu$ L to 100ag/ $\mu$ L of Mtb DNA from the H37Rv reference strain. The LAMP reagents underwent quality control in order to assess their durability and stability for 3 months at a temperature similar to that of a refrigerator (4°C). The kit will be tested on biological sputum samples from patients diagnosed with tuberculosis (TB Group) and patients with any other disease (Non-TB Group) to assess sensitivity and specificity. The detection limit in MilliQ water and in a sputum sample known to be negative was 1fg/ $\mu$ L and the kit was stable for 3 months at a temperature of 4°C. Regarding the performance of the kit, sensitivity and specificity values were obtained, 98.28% and 95.56%, respectively. Due to its high sensitivity together with a good detection limit, the development of a prototype kit, with great diagnostic value, will bring the possibility of a faster and more effective identification of the bacillus that will contribute to a greater discovery of cases and help traditional methods for confirming the disease.

Keywords: tuberculosis; diagnosis; LAMP

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapa de produção do material inicial da técnica de Amplificação Isotérmica em Alça .....	26
Figura 2 - Etapa de amplificação da técnica de Amplificação Isotérmica em Alça .....	27
Figura 3 - Etapa de extensão e reciclagem da técnica de Amplificação Isotérmica em Alça .....	28
Figura 4 - Detecção visual da reação do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTTPCR).....	38
Figura 5 - Limite de detecção do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) em água autoclavada .....	42
Figura 6 - Limite de detecção do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) utilizando amostra biológica de escarro .....	42
Figura 7 - Análise do primeiro teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR).....	43
Figura 8 - Análise do teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) após 15 dias .....	44
Figura 9 - Análise do teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) após 30 dias. ....	44
Figura 10 - Análise do teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) após 60 dias. ....	45
Figura 11 - Análise do teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) após 90 dias. ....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos primers utilizados no teste de LAMP.....	20
Tabela 2 - Reagentes utilizados na reação do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT- PCR), seguindo as especificações descritas por Kohan e colaboradores (2011). .....	33
Tabela 3- Reagentes utilizados na reação kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT- PCR, após modificações nas especificações descritas por Kohan e colaboradores (2011).. .....	34
Tabela 4- Parâmetros de avaliação de comparação do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) na detecção do alvo <i>IS6110</i> com o LAMP convencional e <i>GeneXpert</i> para diagnóstico da tuberculose pulmonar.....	45

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 MARCO TEORICO</b> .....	<b>18</b>
2.1 História da Tuberculose.....	18
2.2 Agente etiológico e genoma.....	18
2.3 Transmissão e patologia .....	20
2.4 Tipos de tuberculose .....	21
2.5 Tratamento da tuberculose .....	21
2.6 Diagnóstico da tuberculose .....	22
2.6.1 <i>Baciloscopia</i> .....	22
2.6.2 <i>Teste de Mantoux (PPD)</i> .....	23
2.6.3 <i>Cultura de micobactérias</i> .....	24
2.6.4 <i>Métodos Moleculares baseados em PCR</i> .....	24
2.6.5 <i>GeneXpert MTB/RIF</i> .....	25
2.6.6 <i>Amplificação Isotérmica de DNA mediada por Loop (LAMP)</i> .....	25
<b>3 PERGUNTA CONDUTORA</b> .....	<b>32</b>
<b>4 HIPÓTESE</b> .....	<b>33</b>
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
5.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	34
5.2 <i>Objetivo Específico</i> .....	34
<b>6 METODOLOGIA</b> .....	<b>35</b>
6.1 <i>Kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR)</i> .....	35
6.2 <i>Avaliação do limite de detecção do kit de LAMP em um único tubo (KIT LAMPLIUTT PCR) utilizando concentrações conhecidas de DNA genômico da cepa de referência H37Rv do <i>Mycobacterium tuberculosis</i></i> .....	35
6.3 <i>Armazenamento dos reagentes do LAMP em único tubo</i> .....	35
6.4 <i>Caracterização de área e população de estudo</i> .....	36
6.5 <i>Avaliação do desempenho do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) em DNA extraído de amostras biológicas de escarro de pacientes diagnosticados com tuberculose pulmonar</i> .....	36
6.6 <i>Critérios de exclusão</i> .....	36
6.7 <i>Métodos de coleta e processamento do material</i> .....	37
6.8 <i>Extração de DNA</i> .....	38

<b>6.9 Amplificação isotérmica em alça (LAMP).....</b>	<b>39</b>
<b>6.10 Considerações Éticas .....</b>	<b>40</b>
<b>6.11 Análise estatística .....</b>	<b>41</b>
<b>7 RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>7.1 Avaliação do limite de detecção da técnica de LAMP .....</b>	<b>42</b>
<b>7.2 Avaliação do desempenho da técnica de LAMP em amostra biológica .....</b>	<b>45</b>
<b>7.3 Avaliação do desempenho do do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT- PCR) na detecção específica do Mtb em amostras de expectoração .....</b>	<b>48</b>
<b>8 DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>9 CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), que afeta principalmente os pulmões (TB pulmonar), porém, pode acometer qualquer outro órgão (TB extrapulmonar). A sua transmissão se dá através do indivíduo bacilífero, ou seja, apresentando a forma ativa da doença, ao expelir pequenas gotículas contendo o *Mtb* por meio da tosse, fala ou espirro, tornando-se passível de inalação por indivíduos susceptíveis. (BUSATTO, 2015, FERRI et al., 2014). A TB faz parte de um conjunto de enfermidades conhecidas como negligenciadas e representa a que possui maior taxa de infecção mundial. (GLAZIOU et al., 2013).

Em 2019, estima-se que cerca de dez milhões de pessoas desenvolveram TB e 1,2 milhão morreram devido à doença, o que ainda mantém a tuberculose como um grave problema de saúde pública mundial (BRASIL, 2021). O Brasil continua entre os 30 países de alta carga para a TB e para coinfeção TB-HIV, sendo, portanto, considerado prioritário para o controle da doença no mundo pela Organização Mundial de Saúde (OMS). (BRASIL, 2021).

No Brasil, a TB continua sendo uma das prioridades em saúde pública. O país notificou 66.819 novos casos em 2020, o que corresponde a um coeficiente de incidência de 31,6 casos/100 mil hab e aproximadamente 4.500 indivíduos vieram a óbito, configurando um índice de mortalidade de 2,2 óbitos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2021).

O estado de Pernambuco registrou neste mesmo ano, 4658 novos casos, sendo o terceiro estado com maior taxa de incidência do Brasil, (48,4 casos/100 mil hab). A cidade do Recife, por sua vez, reportou uma notificação de 85,0 casos a cada 100 habitantes, configurando o segundo lugar dentre as capitais com maior número de casos da doença, ficando atrás somente de Manaus (BRASIL, 2021).

A detecção precoce de um indivíduo com a forma ativa da TB é extremamente necessária para o controle da doença. O diagnóstico laboratorial convencional comumente utilizado na confirmação de casos de TB inclui exame radiológico, a prova tuberculínica (PPD), a baciloscopia e a cultura, sendo essa última, o padrão ouro utilizado para a identificação do *Mtb* (BRANCO, 2012).

Os achados radiológicos permitem determinar tipo e extensão do comprometimento pulmonar, entretanto, não define se o paciente está infectado com o *Mtb*. A prova tuberculínica (PPD) permite identificar uma reação imunocelular indicando contato direto prévio com o bacilo, no entanto, esse teste pode sofrer interferências resultando em falso-positivo, principalmente quando há vacinação da BCG. Portanto, para um país endêmico e a vacinação sendo realizada com frequência, a resposta ao PPD sofre alteração, dificultando o diagnóstico final (BRANCO, 2012; BUSSATTO, 2015). As análises bacteriológicas, as quais englobam a baciloscopia e cultura, apesar de serem exames de fácil realização, necessitam de uma quantidade mínima de bacilos por mililitro de amostra para que o resultado seja detectável, implicando diretamente na sensibilidade do método, mesmo sendo específico. Além disso, ainda que a cultura possa permitir o isolamento do *Mtb*, seu crescimento é lento, podendo perdurar por até oito semanas, sendo considerado um grande entrave na conclusão dos casos e início do tratamento paciente (PUROHIT; MUSTAFA, 2015).

Ensaio moleculares baseados em PCR estão entre os mais promissores novos métodos de diagnósticos quando comparado aos utilizados na rotina. Com isso, foram desenvolvidas metodologias automatizadas baseadas na reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR) para detecção do *Mtb*, sendo o *GeneXpertMTB/RIF* o principal representante desses métodos. Além de ser capaz de detectar o bacilo, essa técnica é capaz de realizar a triagem de resistência bacteriana à uma das principais drogas utilizadas no tratamento da TB (rifampicina). Entretanto, além do teste ter um custo elevado, a Organização Mundial de Saúde (OMS) define que é indicado apenas para uso de amostras de expectoração, limitando o diagnóstico da doença (LIMA et al. 2015; PUROHIT; MUSTAFA, 2015).

A amplificação isotérmica de DNA mediada por *Loop* (LAMP), vem ganhando espaço nos estudos envolvendo diagnóstico de doenças infecciosas por possuir diversas vantagens, incluindo a rapidez, sensibilidade elevada, facilidade de aplicação e baixo custo (NOTOMI et al., 2000; NEONAKIS et al., 2011). Consiste, basicamente, na amplificação e detecção isotérmica de fragmentos contendo o DNA alvo utilizando seis oligonucleotídeos diferentes, especialmente desenhados para amplificar oito regiões no gene de interesse (MORI; NOTOMI, 2009). Estudos anteriores realizados pela equipe do Laboratório de Imunoepidemiologia do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE) obteve um resultado de limite de detecção de 10fg/ $\mu$ L, o que

corresponde à 2 bacilos/ $\mu\text{L}$ , levando em consideração que o DNA genômico de uma cepa de *Mtbé* equivalente a 5fg/ $\mu\text{L}$  (ARYAN, et al., 2010). Além disso, a técnica de LAMP foi testada em 122 amostras de sangue periférico e urina, obtendo uma sensibilidade de 94,9% e especificidade de 77,4%, quando comparada aos testes convencionais de diagnóstico.

Tendo em vista a dispersão geográfica da TB e as limitações dos métodos atuais de diagnóstico, os ensaios moleculares vêm ganhando maior destaque no auxílio e na identificação da bactéria. O protótipo de kit baseado na amplificação isotérmica de DNA mediada por *Loop* (LAMP) em único tubo de baixo custo, alta sensibilidade e eficiente na identificação das várias formas clínicas da doença, sendo produzido no Brasil pode trazer a possibilidade de ter uma técnica inovadora para detecção e controle da tuberculose contribuindo no planejamento de ações específicas, conjuntas e multidisciplinar, impactando na melhoria da eficácia do programa de controle da doença.



## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 História da Tuberculose

A tuberculose provavelmente acomete o homem desde a antiguidade. Relatos baseados em evidências arqueológicas supõe que o primeiro caso de tuberculose no mundo ocorreu em múmias egípcias há mais de 5000 a.C. Esses achados demonstravam anormalidades típicas de comprometimento pela TB e tecidos contendo o DNA do *Mycobacterium tuberculosis*. (MACIEL, 2012)

Achados arqueológicos, na América do Sul, demonstraram presença do bacilo em múmias peruanas em 1.100 a.C. As amostras passaram pelo processo de PCR sendo detectada sequências compatíveis com a do *Mtb* pela técnica. Essa foi a primeira confirmação diagnóstica acerca da tuberculose no continente americano. No entanto, a doença assumiu a condição de epidemia somente a partir da colonização europeia. No Brasil, a epidemia na população indígena trouxe consequências para o país que ainda são evidentes. (MACIEL, 2012)

A colonização portuguesa acometidos com a “peste branca” proporcionou a propagação da enfermidade e morte de muitos nativos. O primeiro portador de tuberculose no país foi o Padre Manuel da Nóbrega, em 1549. Referências compatíveis com quadro clínico de tuberculose foram descritos através das cartas de Inácio Loyola e José de Anchieta enviadas à Portugal. Durante o Brasil Império, há estimativas de que a sua taxa de mortalidade chegava à 1/150 habitantes e, foi nesse momento, que o setor público de saúde concedeu o maior destaque à doença, adotando medidas sanitárias para o problema (DE MACIEL, 2012; GUIMARÃES, 2018; HIJJAR, PROCÓPIO, 2005).

Semelhante a Europa na revolução industrial, a epidemia de tuberculose tornou-se realidade na maior parte das cidades do país, sendo denominada de “praga dos pobres”. A relação com moradias insalubres, baixas condições higiênicas e sanitárias e repletas de pessoas eram comumente observadas nas populações mais acometidas. Além disso, a atenção à saúde era insuficiente e gerida em parceria com os interesses políticos. Nesse cenário, no final do século XIX e início do século XX, a tuberculose foi descrita como a doença mais letal do Rio de Janeiro (MACIEL, 2012).

## 2.2 Agente etiológico e genoma

*Mycobacterium tuberculosis* é uma bactéria de morfologia bacilar reta ou ligeiramente curva, imóvel, não esporulada, não encapsulada com parede celular composta por diversos lipídios, incluindo o ácido micólico, fator determinante para a resistência a coloração de Gram, portanto, sendo coradas pelo método de Ziehl-Neelsen. Esse bacilo é um importante patógeno intracelular aeróbico, logo, necessita de oxigênio para crescer e se multiplicar. Seu tempo de geração é lento, podendo variar de 14 a 20 horas, a depender do meio de cultura empregado (BUSATTO et al., 2015; CAMPOS et al., 2006).

Composto por aproximadamente 4.000 genes e de características únicas, o genoma do *MTB* confere diversas sequências de inserções repetitivas, sendo a *IS6110* a mais frequente, com 1.358 pares de base (CAMPOS, 2006). O elemento é caracterizado por ser específico apenas das micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, mostrando-se altamente conservado. Por essa razão, tem sido utilizado como alvo molecular de estudo no diagnóstico da tuberculose. O *IS6110* é caracterizado por apresentar um número de cópias que variam dependendo da espécie de micobactéria. Cepas que têm mais de sete cópias do *IS*, são classificadas como *High copy IS-number*. Em contrapartida, as que possuem menos de sete, são classificadas como *Lowcopy IS-number*. Acredita-se que um maior número de cópias do *IS6110* esteja associado às cepas altamente patogênicas, apresentando vantagens seletivas e resistência às drogas (ROYCHOWDHURY, MANDAL, BHATTACHARYA, 2015).

## 2.3 Transmissão e patologia

A transmissão da tuberculose de um indivíduo infectado de forma ativa (bacilífero) ocorre por via aérea ao expelir uma carga bacilar diluída em gotículas dispersas no ar contendo aerossóis de *MTB* através da tosse, da fala ou do espirro. Essas partículas, ao serem expostas ao vento e aos raios solares, sofrem ressecamento e passam a ter um volume ainda menor, chamadas de núcleo de Wells. Esse aerossol, por sua vez, eliminado pelo indivíduo infectado, torna-se passível de inalação por indivíduos susceptíveis, dando continuidade à cadeia de transmissão da doença

(BUSATTO, 2015, FERRI et al., 2014).

Pode decorrer de três vias após a inalação dos núcleos de Wells, sendo a primeira, quando o bacilo não consegue se prender ao organismo, estando impedido pelas barreiras naturais do corpo humano (cílios nasais, depuração mucociliar e tosse), além de poder ser eliminado pelo sistema imune. A segunda, quando o bacilo não é completamente destruído pelo sistema imune, porém permanece de forma estável no organismo, tratando-se da forma latente de infecção. E, na última via, desenvolve-se a forma ativa e sintomática da doença (CAMPOS, 2006; LOPES, JANSEN, CAPONE, 2006).

A presença do bacilo e seus antígenos no pulmão do hospedeiro, permite a entrada de células provenientes do compartimento sanguíneo para o núcleo da lesão, sendo inicialmente os neutrófilos, seguidos de células mononucleares e linfócitos. Os antígenos do *MTB* ativam linfócitos do tipo T que produzem interleucinas (ILs) responsáveis por sinalizar para os macrófagos o sítio inicial da infecção, dando-lhes a função de eliminação do bacilo. Receptores de superfície presentes na sua membrana, facilitam a entrada no macrófago, célula responsável por fagocitá-lo. Quando fagocitada, a bactéria passa a residir em um vacúolo ligado à membrana celular, o fagossoma, onde modificará sua maturação e impedirá que o ambiente torne-se hostil para sua sobrevivência. O bacilo, por sua vez, pode viver intracelularmente e os leucócitos hospedeiros, por via hematogênica, podem disseminá-los para diversos órgãos, permitindo assim, lesões extrapulmonares (KOZAKEVICH, DA SILVA, 2016; LOPES, JANSEN, CAPONE, 2006; FERRI et al., 2014).

## **2.4 Tipos da Tuberculose**

A apresentação da tuberculose na forma pulmonar, além de ser mais frequente, é também a mais relevante para a saúde pública, pois é a forma pulmonar bacilífera, a responsável pela manutenção da cadeia de transmissão da doença. Embora o *MTB* acometa principalmente os pulmões, ele pode disseminar-se por via linfática ou sanguínea e alojar-se em qualquer órgão do corpo, sendo caracterizada a tuberculose extrapulmonar (TBEP). Os principais órgãos a serem atingidos são aqueles com maior aporte sanguíneo, por possuírem maior quantidade de oxigênio, sendo eles a pleura,

gânglios, rins, ossos e região meningoencefálica, porém, menos ideais quando trata-se de condições de crescimento e multiplicação (CAMPOS, 2006; HUSTON, 2014).

A tuberculose extrapulmonar, por se tratar de amostras paucibacilares, ou seja, quantidade pequena de bacilo, a evolução da sintomatologia é lenta, sendo diretamente proporcional ao dano no núcleo da lesão. Em contrapartida, a circulação de bacilos pela via hematogênica permite a sua pesquisa em amostras menos invasivas como sangue e urina. A identificação do microorganismo nessas amostras contendo o MTB, além das amostras de expectoração, promove, através de testes moleculares, resultados mais rápidos, sensíveis e específicos quando comparado com testes laboratoriais e microbiológicos (LACERDA et al., 2011, HUSTON, 2014).

## 2.5 Tratamento da Tuberculose

O tratamento tradicional da tuberculose é composto por quatro drogas, isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, administradas por via oral num período de seis meses a um ano. O objetivo é a cura do paciente, bem como prevenir a propagação da doença e evitar o surgimento da tuberculose resistente. Para isso, é necessário um diagnóstico precoce, triagem de resistência a fármacos e tratamento assistido, para garantir que a terapia medicamentosa será seguida corretamente (Zumla; Nahid; Cole, 2013; Kaur et al., 2014).

A isoniazida é um antimicrobiano com capacidade bactericida, formado por um anel de pirimidina e um grupo hidrazida análogo a nicotinamida. A INH penetra na célula do hospedeiro e difunde-se através da membrana do *Mtb*. Trata-se de uma pró-droga, ou seja, necessita de ativação, realizada através da ação oxidativa da catalase-peroxidase da enzima KatG. (Kolyva e Karakousis, 2012).

A rifampicina (RIF) é um antibiótico de amplo espectro mais utilizado para o tratamento da TB. Demonstra atividade bactericida rápida, junto a isoniazida são os agentes esterilizantes mais potentes disponíveis contra o bacilo. Estruturalmente a RIF contém núcleo aromático ligado em ambos os lados por uma ponte alifática. O mecanismo de ação é descrito pela capacidade da rifampicina em ligar-se a subunidades  $\beta$  da RNA polimerase codificada pelo gene *rpoB*, com capacidade de inibir a etapa de transcrição da microbactéria (Rossetti, et al. 2002).

A pirazinamida (PRZ) assim como a isoniazida é um pró-fármaco convertido para

forma ativa pela enzima pirazinamidase (PZase), codificada pelo gene *pncA* produzida pelo *Mtb*. Trata-se de um análogo estrutural da nicotinamida capaz de interromper a produção de energia da membrana bacteriana, inibindo a síntese de ácidos graxos, impedindo assim o transporte realizado através membrana plasmática. A PRZ foi introduzida ao esquema terapêutico da tuberculose em 1980 e contribuiu para diminuição no tempo de tratamento, de 9 para 6 meses graças a sua capacidade de inibir bacilos semi-dormentes que resistem a ambientes ácidos (Silva e Palomino, 2011).

O etambutol (EMB) é um agente anti-tuberculose que junto com a isoniazida, rifampicina e pirazinamida constitui o esquema de tratamento de seis meses utilizado no combate ao *Mtb*. Quimicamente nomeado de *destro-etilenodiamido-di-1-butanol-dihidroclorido* atua diretamente na síntese de arabinose. Dispara o alvo principal o gene *embB* e é capaz de impedir a incorporação do ácido micólico comum a membrana da micobactéria (Vasava, et al. 2017).

## 2.6 Métodos de Diagnósticos

O diagnóstico da tuberculose é feito através da análise dos critérios clínico e epidemiológico, além dos achados radiológicos, pesquisa bacteriológica (baciloscopia e cultura), exames histopatológicos, achados imunológicos (Teste de Mantoux - PPD) e achados moleculares, como o *GeneXpertMTB/RIF*. Entretanto, existem parâmetros que permitem positivar ou não determinada amostra estudada.

### 2.6.1 Baciloscopia

A baciloscopia só apresenta positividade quando há, no mínimo, 5.000 bacilos por mililitro. A cultura, por sua vez, requer uma quantidade menor de microrganismos dispersos na amostra quando comparado a baciloscopia, porém, devido ao crescimento lento do *MTB*, as colônias levam entre seis e oito semanas para crescer, sendo considerado um entrave na conclusão da investigação e inicialização do tratamento (CAMPOS, 2006).

### 2.6.2 *Teste de Mantoux (PPD)*

O teste de Mantoux (PPD), por sua vez, permite identificar uma reação imunocelular a partir de uma proteína pertencente ao bacilo, a tuberculina. Essa reação possibilita que os linfócitos T, com o auxílio dos macrófagos, produzam uma resposta de hipersensibilidade cutânea entre 48 e 72 horas. Com isso, é possível indicar se o organismo entrou em contato com a bactéria. No entanto, esse teste pode sofrer interferências resultando em falso-positivo, principalmente quando há vacinação da BCG. Logo, para um país endêmico e a vacinação sendo realizada com frequência, o resultado do PPD sofre alteração, dificultando o diagnóstico final (BRANCO, 2012; BUSSATTO, 2015).

### 2.6.3 *Cultura de micobactérias*

O diagnóstico presuntivo da tuberculose é feito através da história de contato do paciente com o bacilo, achados radiológicos e a confirmação da infecção obtida através da positividade bacteriológica por meio de técnicas envolvendo meios de culturas específicos para crescimento de micobactérias (DOS SANTOS SILVA, 2019).

A cultura de amostra de expectoração é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da tuberculose por apresentar uma elevada especificidade. No entanto, não permite diferenciar espécies de micobactérias e pode levar até oito semanas para haver crescimento bacteriano, sendo uma das grandes limitações do diagnóstico da doença (DOS SANTOS SILVA, 2019).

### 2.6.4 *Métodos moleculares baseados em PCR*

Técnicas moleculares vem ganhando espaço na identificação e diagnósticos de doenças infecciosas. São considerados métodos mais atraentes possuindo maior vantagem na liberação do resultado. A PCR em tempo real permite amplificação de DNA ou RNA de maneira mais precisa e com maior reprodutibilidade, sendo capaz de determinar valores durante a fase exponencial da reação. No entanto, é uma metodologia que é incapaz de indicar a viabilidade do microorganismo, permitindo que

resultados falso-positivos sejam comuns em regiões endêmicas e com alta prevalência de casos de tuberculose. (PUROHIT, MUSTAFA, 2015).

Além das limitações já descritas da técnica, os ensaios baseados em PCR possuem um elevado custo de implementação, necessitar de um técnico altamente treinado para a execução do procedimento (PARIDA et al., 2008; ARYAN et al., 2010; PUROHIT, MUSTAFA, 2015).

#### 2.6.5 *GeneXpert MTB/RIF*

O *GeneXpertMTB/RIF* é uma técnica molecular automatizada baseada em PCR em tempo real que, além de detectar o DNA do *MTB*, também possibilita a pesquisa de um gene específico de resistência a rifampicina, o *rpoβ*.

O sistema utiliza cartuchos contendo todos os reagentes liofilizados necessários para a realização da PCR em tempo real. Além disso, compõe 5 sondas que se anelam as regiões mutadas do gene *rpoβ*, determinando a resistência a rifampicina. (BRATS, 2011).

A grande desvantagem dessa técnica é a restrição de amostra, sendo utilizada apenas para amostras de expectoração. Alguns estudos mostram que o desempenho do *geneXpert* ainda não está claro para amostras extrapulmonares, o que torna necessária a expansão de estudos envolvendo ensaios moleculares para diagnóstico de outras formas de tuberculose (MAYNARD-SMITH et al, 2014; LIMA et al, 2017; RUFAL et al, 2015). Além disso, também é caracterizado como um método de diagnóstico de elevado custo e baixa sensibilidade em amostras de sítios de infecção extrapulmonar. (PUROHIT, MUSTAFA, 2015).

#### 2.6.6 *Amplificação Isotérmica de DNA mediada por Loop (LAMP)*

Apesar dos métodos moleculares apresentarem diversas vantagens, em comparação com técnicas convencionais de diagnósticos, ainda são ensaios que possuem difícil implementação, sobretudo em países em desenvolvimento, uma vez que há necessidade de grandes investimentos como equipamentos sofisticados, técnicos altamente treinados e estruturação. Com isso, a amplificação isotérmica de DNA tem como objetivo contornar essas desvantagens, sendo um método rápido,

sensível e barato, contribuindo na identificação precoce de novos casos de tuberculose e, com isso, quebrando a cadeia de transmissão do bacilo. (PARIDA et al., 2008; NUNES, 2013).

A amplificação isotérmica de DNA mediada por loop foi desenvolvida por NOTOMI et al (2000) e é uma técnica capaz de amplificar, sob condições de temperatura constante, uma grande quantidade de DNA alvo em um curto intervalo de tempo. tempo (NEONAKIS, SPANDIDOS, PETINAKI, 2011; NOTOMI et al, 2000).

O LAMP utiliza uma enzima termoestável chamada *Bst* polimerase juntamente com três pares de primers que são desenhados para amplificar cerca de oito regiões do DNA alvo (NEONAKIS, SPANDIDOS, PETINAKI, 2011). Essa enzima foi isolada de uma bactéria mesófila *Bacillus stearothermophilus*. Classificada como uma DNA polimerase I, é uma enzima com atividade de abertura e liberação de fita simples de DNA (MCCLARY et al, 1991).

O LAMP é caracterizado pela utilização de três pares de oligonucleotídeos: os primers internos (FIP E BIP), que amplificam regiões internas do DNA alvo e os primers externos (F3 E B3), que reconhecem sequências mais externas e atuam na separação da dupla fita. Além disso, também podem ser utilizados nos ensaios de LAMP os Loop primers (FLP E BLP), que se anelam nas estruturas de alça formadas durante as etapas de amplificação e tem como função aumentar a especificidade e acelerar a reação por hibridizarem em sítios adicionais não acessados pelos primers internos (MORI, NOTOMI, 2009; NUNES, 2013).



Os primers internos (FIP e BIP) são constituídos de duas sequências distintas: a porção F2 (B2 no reverso) que se anela aos estágios iniciais da amplificação e a porção F1c (B1c), que se anela as etapas finais da reação. Logo, o primer interno *forward* é constituído pela sequência F2, um espaçador (TTTT) e a sequência F1c, enquanto o primer interno reverso possui uma sequência B2, um espaçador e a sequência B1c. Os primers externos são constituídos por uma única sequência F3 (B3), complementar a uma sequência F3c (B3c) no gene alvo (NOTOMI et al, 2000)

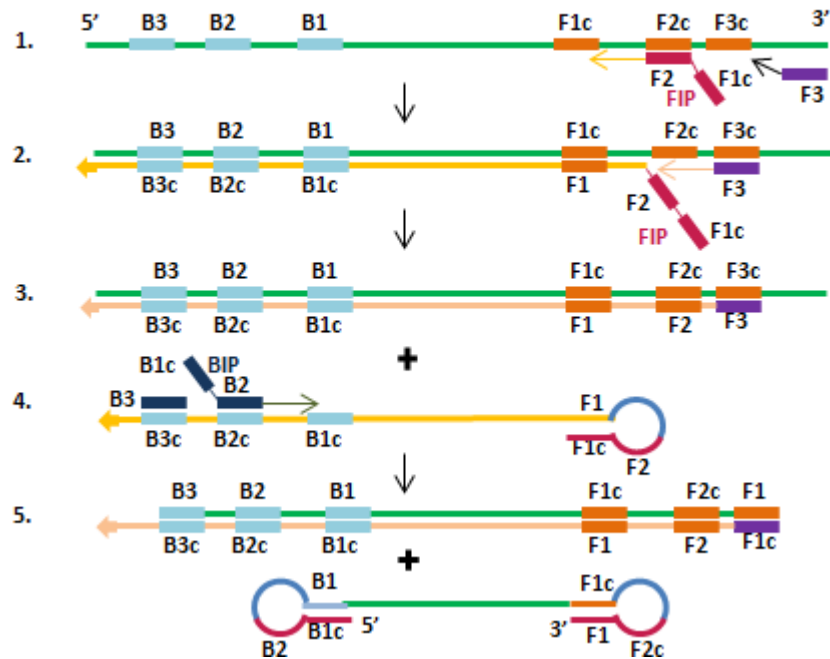
A amplificação por LAMP compreende duas etapas: a parte cíclica, onde ocorre a produção de material inicial e a parte de extensão e reciclagem (MORI, NOTOMI, 2009). Inicialmente, o primer interno FIP hibridiza, na sua porção F2, a região complementar ao DNA alvo (F2c), iniciando o processo de amplificação pela DNA polimerase. Posteriormente, o primer externo F3 se anela em uma região complementar (F3c), que se localiza em uma posição anterior a região F2c (NOTOMI et al, 2000; TOMITA et al, 2008).

A hibridização do primer externo (F3) ocorre posterior a do primer interno (FIP), pois o F3 possui bases mais curtas e está em uma concentração menor. Com o início da síntese da fita de DNA iniciada pelo primer externo, ocorre a liberação da fita ligada ao primer interno (NOTOMI et al, 2000; TOMITA et al, 2008).

Devido a estrutura do primer FIP (F2 + F1c), a porção F1c se anela a sequência F1 da própria fita por complementariedade de bases, que se localiza numa região mais interna do que F2c, formando uma alça em sua extremidade. A fita contendo a alça é utilizada como um molde para os primers reversos interno (BIP) e externo (B3), que se anelam na mesma e iniciam a síntese de uma nova fita de DNA, repetindo o processo descrito anteriormente. O produto final dessa etapa é uma estrutura composta por uma alça em ambas as extremidades, conforme observado na figura 1 (NOTOMI et al, 2000; TOMITA et al, 2008; PARIDA et al., 2008).

**Figura 1** - Etapa de produção do material inicial da técnica de Amplificação Isotérmica em Alça

### I. Etapa de produção do material inicial

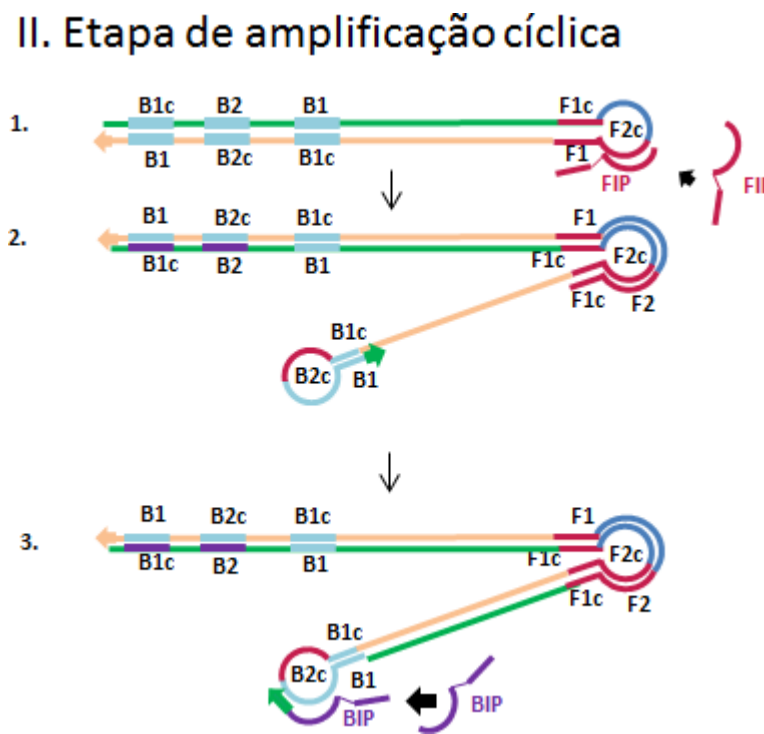


**Legenda:** Etapa de produção do material inicial da técnica de LAMP. O primer reverso interno (BIP) é representado pela cor azul-escura, sendo contituído pelas porções B1c e B2. O primer reverso externo (B3), também é representado pela cor azul-escura. As regiões em azul claro (B3, B2 e B1; B3c, B2c e B1c) representam áreas da fita de DNA alvo que são complementares aos primers reversos. O primer *forward* interno (FIP) é representado pela cor vermelha, sendo contituído pelas porções F1c e F2. O primer *forward* externo (F3), também é representado pela cor vermelha. As regiões em laranja (F3, F2 e F1; F3c, F2c e F1c) representam áreas da fita de DNA alvo que são complementares aos primers *forward*. Início da reação, havendo o anelamento do primer FIP. **2.** Extensão da fita complementar iniciada pelo primer FIP, seguido do anelamento do primer F3. **3.** Extensão da fita complementar iniciada pelo primer F3, que resulta na liberação da fita complementar iniciada pelo primer FIP. **4.** Formação da estrutura de alça em uma das extremidades da fita de DNA complementar liberada, acompanhada pelo anelamento do primer reverso BIP na extremidade oposta. Durante a etapa de extensão, ocorre também o anelamento do primer reverso B3. **5.** Extensão da fita complementar iniciada pelo primer B3, que resulta na liberação da fita complementar iniciada pelo primer BIP, havendo a formação de alças em cada uma das extremidades da fita, deixando-a com o formato de “halteres”, sendo esse o produto final da etapa de iniciação.

**Fonte:** Adaptado de Notomi et al (2000).

A amplificação cíclica ocorre quando o primer FIP se anela às sequências complementares presentes em uma das alças da estrutura formada. A ligação do FIP também faz com que a alça presente na extremidade oposta seja desfeita, liberando as regiões complementares ao primer BIP, que se anelam, formando uma nova alça. O conjunto dessas alterações leva ao surgimento de estrutura intermediária de DNA. Como resultado desse processo, estruturas de vários tamanhos consistindo de repetições alternadas invertidas da sequência alvo são formadas na mesma fita. A reação cíclica continua levando ao acúmulo de aproximadamente  $10^9$  cópias do gene alvo em menos de uma hora (NOTOMI et al, 2000; NUNES, 2013).

**Figura 2** - Etapa de amplificação da técnica de Amplificação Isotérmica em Alça



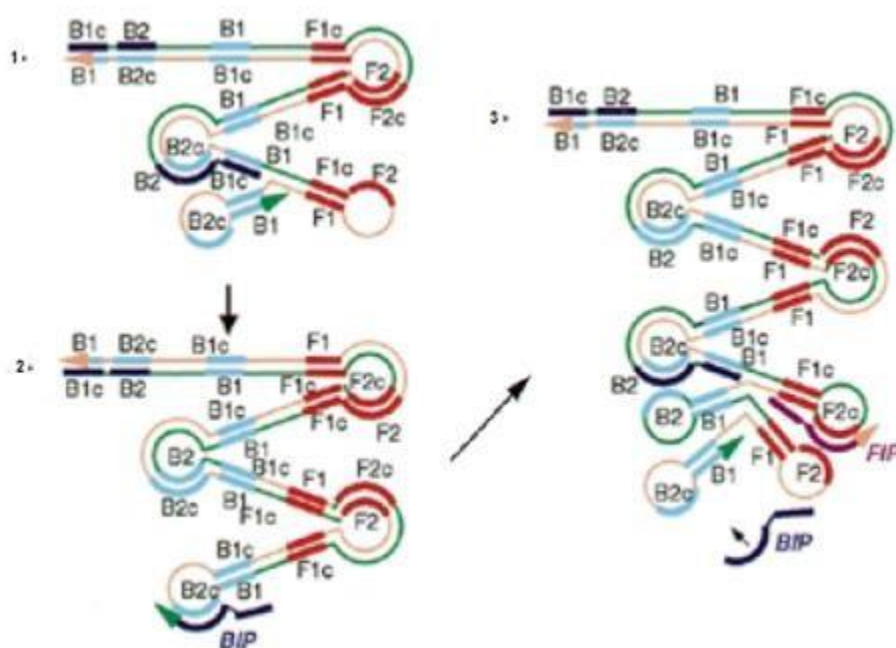
**Legenda:** Etapa de amplificação cíclica da técnica de LAMP. O primer reverso interno (BIP) é representado pela cor violeta. As regiões em azul (B3, B2 e B1; B3c, B2c e B1c) representam áreas da fita de DNA alvo que são complementares ao primers reverso. O primer *forward* interno (FIP) é representado pela cor vermelha. As regiões identificadas como F3, F2 e F1; F3c, F2c e F1c representam áreas da fita de DNA alvo que são complementares ao primer *forward*.

formando uma nova alça. O resultado final é uma estrutura intermediária, com o dobro de tamanho da região alvo, constituída por duas alças e uma extremidade livre.

**Fonte:** Adaptado de Notomi et al (2000).

**Figura 3** - Etapa de extensão e reciclagem da técnica de Amplificação Isotérmica em Alça

### III. Extensão e reciclagem



**Legenda:** Etapa de extensão e ciclagem da técnica de LAMP. O primer reverso interno (BIP) é representado pela cor azul-escuro. As regiões em azul (B3, B2 e B1; B3c, B2c e B1c) representam áreas da fita de DNA alvo que são complementares aos primers reversos. O primer *forward* interno (FIP) é representado pela cor violeta. As regiões identificadas como F3, F2 e F1; F3c, F2c e F1c, em vermelho, representam áreas da fita de DNA alvo que são complementares ao primer *forward*. **1.** A estrutura formada na etapa de amplificação cíclica servirá de molde para o anelamento do primer BIP. **2.** O primer BIP repetirá o processo realizado pelo primer FIP: A síntese de uma nova fita de DNA, faz com que a alça presente na extremidade oposta seja desfeita, liberando as regiões complementares ao primer FIP, seguido do anelamento dessas regiões, que formam uma nova alça. **3.** Esse processo irá iniciar uma cascata, onde ocorrerá a

repetição das etapas anteriormente citadas, tornando a molécula de DNA cada vez maior a cada ciclo.

**Fonte:** Adaptado de Notomi et al (2000).

### 3 PERGUNTA CONDUTORA

O kit molecular baseado em LAMP em um único tubo é eficaz na detecção do *Mycobacterium tuberculosis* para o diagnóstico da tuberculose pulmonar?

#### 4 HIPÓTESE

O KIT molecular baseado em LAMP em um único tubo é eficaz na detecção do *Mycobacterium tuberculosis* para o diagnóstico da tuberculose pulmonar.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

Desenvolver um kit baseado em amplificação isotérmica de DNA mediada por *Loop* (LAMP-PCR) em único tubo para o diagnóstico da tuberculose pulmonar.

### 5.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o limite de detecção do kit de LAMP em um único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) utilizando concentrações conhecidas de DNA genômico da cepa de referência H37Rv do *Mycobacterium tuberculosis*;
- b) Avaliar, em condições controladas de estocagem por um período máximo de 3 meses, a estabilidade do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR);
- c) Avaliar o desempenho do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) em DNA extraído de amostras biológicas de escarro de pacientes diagnosticados com tuberculose pulmonar;
- d) Comparar o desempenho do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) com o LAMP convencional e os testes convencionais de diagnóstico.



## 6 METODOLOGIA

### 6.1 Kit de LAMP em único tubo (*KIT LAMPLIUTT-PCR*)

O *KIT LAMPLIUTT-PCR* foi desenvolvido a partir da técnica de amplificação isotérmica de DNA mediada por *Loop* (LAMP) previamente otimizada pelo grupo, associada a tecnologia de único tubo (modelo passível de patente), para detecção do alvo molecular *IS6110*.

O kit tem capacidade de performar até cinquenta reações, sendo constituído por microtubos de 0,2 mL contendo todos os reagentes necessários para a realização da técnica.

Com o intuito de auxiliar na detecção visual, em conjunto com os reagentes, foi adicionada ao kit uma lanterna de emissão de radiação ultravioleta (UV). Além disso, os reagentes e a lanterna foram encaminhados em uma caixa especificamente desenhada para acondicionar os insumos do *LAMPLIUTT-PCR KIT*, com a finalidade de manter a temperatura e a umidade estáveis.

### 6.2 Avaliação do limite de detecção do kit de LAMP em um único tubo (*KIT LAMPLIUTT-PCR*) utilizando concentrações conhecidas de DNA genômica da cepa de referência H37Rv do *Mycobacterium tuberculosis*

A reação de LAMP em único tubo foi realizada seguindo as recomendações descritas por KOHAN et al., 2011.

Para avaliar e definir o limite de detecção do *KIT LAMPLIUTT-PCR*, foi feita uma curva de diluição de DNA do *Mtb*, da cepa de referência H37Rv na proporção de 1:10, variando de 100pg/μL à 1fg/μL, inicialmente em água *MilliQ*<sup>®</sup>, afim de avaliar possíveis inibidores que poderiam estar presentes no ensaio.

A curva de diluição na amostra biológica de escarro foi realizada a partir de um controle negativo (amostra sabidamente negativa com exames laboratoriais convencionais e moleculares negativos de paciente sem TB) submetido ao processo de extração de DNA. A amostra extraída foi contaminada com uma alíquota de DNA

da cepa de referência H37Rv do *Mtb*, de concentração conhecida, previamente dosada em *nanodrop 2000*. A partir da concentração inicial, foi feita uma diluição, na proporção de 1:10, variando de 100pg/μL à 100ag/μL.

### **6.3 Armazenamento dos reagentes do LAMP em único tubo**

Os reagentes foram armazenados dentro de uma caixa especificamente desenhada com a finalidade de avaliar sua durabilidade em temperatura de geladeira (4°C), sendo considerada a temperatura ideal para armazenamento de reagentes e kit de diagnósticos. Essa análise foi realizada no dia zero até 90 dias (3 meses).

A análise da estabilidade dos reagentes estocados na temperatura e condição descrita acima, foi avaliada em um período máximo de 3 meses. Inicialmente, um ensaio foi realizado no primeiro dia, outro após 15 dias e um terceiro após 30 dias. Posterior a isso, foram feitas análises mensais até o terceiro mês.

### **6.4 Caracterização de área e população de estudo**

O *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) e o biorrepositório localizado no Laboratório de Imunoepidemiologia/FIOCRUZ/PE. Além disso, foram selecionadas amostras biológicas de escarro, de ambos os gêneros, faixa etária variada de pacientes provenientes dos serviços de saúde do SUS de Pernambuco, mais precisamente do Hospital Agamenon Magalhães (HAM).

O diagnóstico e tratamento específico foi conduzido pelo médico responsável do serviço público de saúde. Os exames de cultura em meio específico e os testes laboratoriais moleculares foram executados nos Laboratórios de Imunoepidemiologia (LIE), situado no Departamento de Imunologia e no Núcleo de Plataforma Tecnológica (NPT) do Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (IAM/Fiocruz).

### **6.5 Avaliação do desempenho do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) em DNA extraído de amostras biológicas de escarro de pacientes diagnosticados com tuberculose pulmonar**

#### **6.5.1 Definições dos grupos para coleta de amostras biológicas:**

As amostras biológicas de escarro foram extraídas e alocadas em dois grupos de acordo com os critérios clínico-epidemiológicos e laboratoriais:

- a) **Grupo TB pulmonar:** Amostras biológicas de pacientes provenientes dos serviços públicos de saúde com evidências clínicas e epidemiológicas e diagnóstico confirmado bacteriologicamente através dos exames de baciloscopia, cultura, raio X de tórax ou o teste molecular *GeneXpert MTB/RIF*.
- b) **Grupo sem TB:** Amostras biológicas de pacientes provenientes dos serviços públicos de saúde sem TB que procuraram o serviço de saúde por outra doença, com quadro clínico e laboratorial não compatível com a tuberculose e epidemiologia negativos para TB.

## 6.6 Critérios de exclusão

Amostras biológicas coletadas de maneira insuficiente ou incorreta para processamento e casos onde houve contaminação da cultura.

## 6.7 Métodos de coleta e processamento do material

### 6.7.1 Amostra de escarro

Foram coletados através de eliminação espontânea de 1 à 5 mL de escarro, em tubo seco rosqueado e estéril, em uma única amostra com o paciente ao acordar, em jejum. No Laboratório de Imunoepidemiologia, foi realizada a descontaminação do material seguindo o protocolo do Método de Petroff (NaOH4%) (BRASIL, 2008) e acondicionadas a -20°C para o processamento de extração de DNA, utilização no kit de LAMP em único tubo, no LAMP convencional e *GeneXpert*. Uma outra alíquota da amostra descontaminada foi enviada ao Laboratório de NB3 do IAM/FIOCRUZ para realização da cultura de micobactérias.

## 6.8 Extração de DNA

A extração de DNA da amostra foi realizada através do *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. Inicialmente, em um microtubo, 20 µl de proteinase K foram adicionados a uma alíquota de 200 µl da amostra *in natura* juntamente com 200 µl do *Buffer AL*, cujo conteúdo foi homogeneizado no vórtex por 15 segundos e incubado em banho-maria à 56°C por 10 minutos. Posteriormente, foi submetida à centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto. Após centrifugação, foram adicionados 200 µl de etanol (96 – 100%) à amostra e, novamente, agitadas em vórtex por 15 segundos. Logo após, foi novamente centrifugada a 13.000 rpm por 1 minuto. O conteúdo do tubo foi transferido para a coluna específica do kit e centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi colocada em um novo tubo coletor do kit e o tubo contendo o produto da centrifugação foi descartado. Adicionou-se à coluna 500 µl do *Buffer AW1* e foi realizada a centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. Imediatamente, a coluna foi colocada em um novo tubo coletor e o tubo contendo o filtrado foi descartado. O *Buffer AW2* foi adicionado a amostra e centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos. O conteúdo do tubo coletor foi desprezado e, logo em seguida, foi novamente centrifugado a 13.300 rpm. A etapa posterior consistiu em colocar a coluna em um microtubo previamente identificado e adicionar 200 µl do *Buffer AE*. A amostra foi incubada em temperatura ambiente durante 5 minutos para melhor concentração do DNA, e por último, centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto, sendo descartada a coluna e guardado o microtubo contendo o produto da extração a -20 °C.

### 6.9 Amplificação isotérmica em alça (*LAMP*)

Foram utilizados três pares de primers para a amplificação do alvo molecular *IS6110*, sendo um par de primers externos (F3, B3), um par de primers internos (FIP, BIP) e um par de primers do loop (FLP, BLP) trazendo maior especificidade e velocidade de reação. Os primers estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1** - Sequências dos primers utilizados no teste de LAMP

Primers	Sequência	Tamanho
F3	CCTAACCGGCTGTGGG TA	18

B3	CGAGTACGCCTTCTTG TTGG	20
FIP	GACGTAGGCGTCGGTG ACAAAGGCAGACCTCA CCTATGTGTC	42
BIP	GTCGCTTCCACGATGG CCACGGTCCAGATGGC TTGCTC	38
FLP	TAGGCGAACCCCTGCCC A	17
BLP	TGGTCCTCGACGCGAT C	17

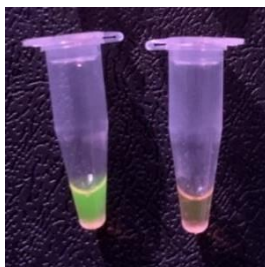
---

Fonte: kohan et al., 2011 (tradução nossa)

O estudo utilizou como base os protocolos descritos por Kohan e colaboradores (2011), otimizando-os para maximizar a qualidade do ensaio. As amplificações foram feitas em um termobloco, utilizando uma temperatura constante de 68°C durante 40 minutos, seguida por uma inativação enzimática a uma temperatura de 80°C por 10 minutos. O volume final da reação de LAMP foi de 25 µL, contendo 40 µM de cada F3 e B3, 20 µM de cada FIP e BIP, 5 µM de cada FLP e BLP, Tampão *Isothermal Amplification Buffer* (BioLabs®) 1x, 9 mM de MgSO<sub>4</sub>, 2,8 mM de dNTP, 5 M de Betaína, 5% de DMSO, 3 U/µl da enzima *Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase* (BioLabs®) e 3 µl de amostra de DNA.

Os resultados da reação de amplificação isotérmica de DNA mediada por loop foi visualizada a olho nu, através da adição de SYBR Green, segundo Tomita et al. (2008).

**Figura 4** – Detecção visual da reação do kit de LAMP em único tubo (*KIT LAMPLIUTT-PCR*)



Nota: Detecção visual da reação do kit de LAMP em único tubo (*KIT LAMPLIUTT-PCR*) utilizando o *SYBR Green*. O resultado é considerado positivo quando ocorre a viragem de coloração de laranja para verde após o *SYBR Green* se intercalar na dupla fita de DNA.

**Fonte:** O autor

## 6.10 Considerações Éticas

Todos os indivíduos selecionados para a pesquisa receberam um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para assinarem, em duas vias e preencheram uma ficha clínica onde continha todas as informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais que serão registradas no banco de dados do Laboratório de Imunoepidemiologia para posterior análises estatísticas. O presente estudo passou pelo comitê de ética da instituição sendo aprovado com a numeração de CAAE: 51761021.5.0000.5190.

## 6.11 Análise estatística

Os dados foram analisados em termos de sensibilidade, especificidade e eficiência, com intervalos de confiança de 95%, para fins de acurácia do kit.

Para confiabilidade do kit de LAMP em único tubo (*KIT LAMPLIUTT-PCR*), foi calculada a concordância do kit juntamente com as técnicas de diagnósticos convencionais para tuberculose pulmonar utilizando o índice Kappa.

## 7 RESULTADO

### 7.1 Avaliação do limite de detecção do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR)

Com o intuito de otimizar e avaliar a quantidade mínima de DNA detectada pelo kit de LAMP em um único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR), foi realizada uma curva de diluição seriada utilizando, inicialmente, a cepa de referência do *M. tuberculosis* (H37Rv) em água autoclavada. A curva de diluição tinha concentrações que variou de 100pg/  $\mu\text{L}$  à 100ag/  $\mu\text{L}$ .

Foram utilizadas as especificações descritas por Kohan e colaboradores (2011), como descrito na tabela 2, no entanto, após feito ensaio de LAMP, nenhum ponto da curva foi positivo após a adição do fluoroforo *SYBER Green* (Tabela 2).

**Tabela 2** - Reagentes utilizados na reação do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR), após modificações nas especificações descritas por Kohan e colaboradores (2011).

	Concentração	Volume
Tampão	1x	2,5 $\mu\text{L}$
Betaína	0,8M	4 $\mu\text{L}$
MgSO <sub>4</sub>	9 mM	2,25 $\mu\text{L}$
dNTP	1,4 mM	3,5 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	-	2,125 $\mu\text{L}$
DMSO	5%	1,25 $\mu\text{L}$
F3	0,2 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
B3	0,2 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
FLP	0,8 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
BLP	0,8 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
FIP	1,6 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
BIP	1,6 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
<i>Bst 2.0 DNA Polymerase</i>	8 u/ $\mu\text{L}$	0,375 $\mu\text{L}$
DNA	-	3 $\mu\text{L}$
Total		25 $\mu\text{L}$

Fonte: O autor

As especificações de Kohan e colaboradores sofreram alterações visando uma melhor otimização, reprodutibilidade e qualidade do ensaio. As concentrações de Betaína, dNTP e dos primers (F3, B3, FIP, BIP, FLP, BLP) foram modificadas e a enzima utilizada foi a *Bst DNA polymerase 2*. Além disso, o sulfóxido de dimetilo (DMSO), que tem como função aumentar a estabilidade da enzima também foi adicionado a reação.

**Tabela 3-** Reagentes utilizados na reação do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR), após modificações nas especificações descritas por Kohan e colaboradores (2011).

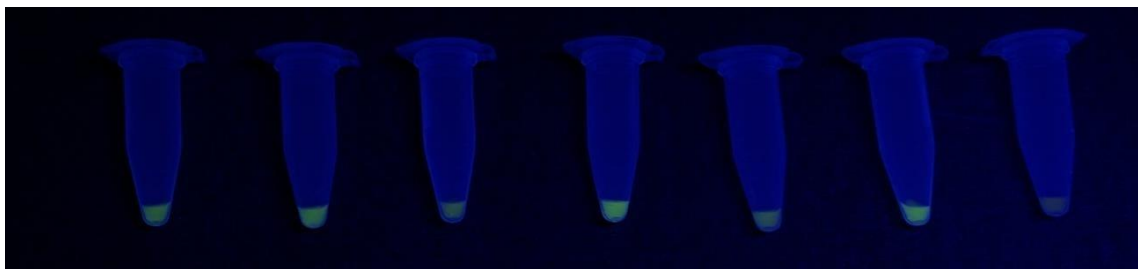
	Concentração	Volume
Tampão	1x	2,5 µL
Betaína	5 M	4 µL
MgSO <sub>4</sub>	8 mM	2,25 µL
dNTP	2,8 mM	3,5 µL
H <sub>2</sub> O	-	2,125 µL
DMSO	5%	1,25 µL
F3	5 µM	1 µL
B3	5 µM	1 µL
FLP	20 µM	1 µL
BLP	20 µM	1 µL
FIP	40 µM	1 µL
BIP	40 µM	1 µL
<i>Bst 2.0 DNA Polymerase</i>	5 u/µL	0,375 µL
DNA	-	3 µL
Total		25 µL

Fonte: O autor

Após todas as alterações de protocolo, o kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) foi capaz de detectar o alvo molecular do estudo, o *IS6110*. Utilizando a curva de diluição anteriormente descrita, o limite de detecção em água autoclavada foi de 1fg/µL (Figura 5).



**Figura 5** – Limite de detecção do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) em água autoclavada.

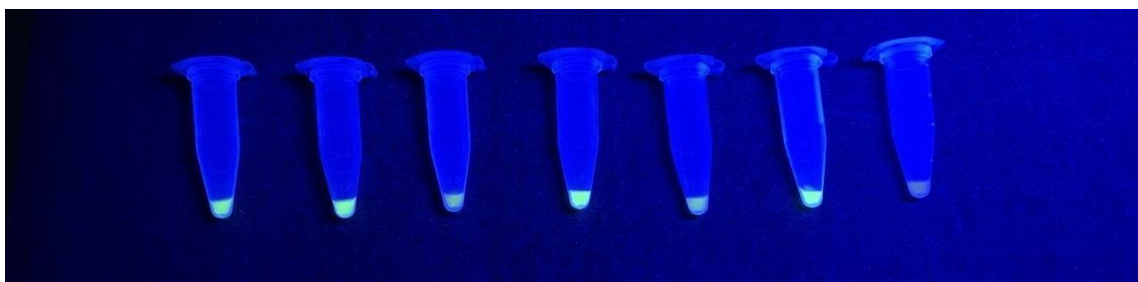


Nota: Curva de diluição para avaliação do limite de detecção do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR), obtendo amplificação até a concentração de 1fg/μL. Os tubos contém concentração de 100pg/ μL, 10pg/ μL, 1pg/ μL, 100fg/ μL, 10fg/ μL e 1fg/ μL, respectivamente. O último é o controle negativo da reação contendo 0ng/ μL de DNA.

Fonte: O autor

O limite de detecção do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT- PCR) também foi avaliado utilizando curvas de diluição de DNA de cepa de referência do *M.tuberculosis* em amostra de escarro, sendo utilizado o protocolo anteriormente descrito. O limite de detecção foi de 1fg/ μL (Figura 6).

**Figura 6** – Limite de detecção do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) utilizando amostra biológica de escarro.



Nota: Curvas de diluição para avaliação do limite de detecção do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) em amostra de escarro. Foi obtido amplificação até a concentração de 1fg/μL. Os tubos continham concentração de 100pg/ μL, 10pg/ μL, 1pg/ μL, 100fg/ μL, 10fg/ μL e 1fg/ μL, respectivamente, sendo o último, o controle negativo.

Fonte: O autor

## 7.2 Avaliação das condições de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR)

Com o objetivo de avaliar as condições de estocagem e estabilidade do kit, o

mesmo passou por uma análise por um período máximo de três meses (90 dias) acondicionado em caixas especificamente desenhadas para essa finalidade em temperatura de geladeira (4°C).

A análise de estabilidade dos reagentes estocados na temperatura descrita acima foi avaliada, inicialmente, no primeiro dia, posteriormente após 15 dias e um terceiro teste após 30 dias. Em seguida, foram feitos testes mensais até o terceiro mês.

**Figura 7** – Análise do primeiro teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR)



Legenda: Primeiro teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) em condições de temperatura de geladeira. Os tubos continham concentrações de DNA de 100pg/  $\mu\text{L}$ , 100fg/  $\mu\text{L}$ , 1fg/  $\mu\text{L}$  e o controle negativo.

Fonte: O autor

**Figura 8** – Análise do teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) após 15 dias



Nota: Teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) em condições de temperatura de geladeira após 15 dias. Os tubos continham concentrações de DNA de 100pg/  $\mu\text{L}$ , 100fg/  $\mu\text{L}$ , 1fg/  $\mu\text{L}$  e o controle negativo.

Fonte: O autor.

**Figura 9** – Análise do teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) após 30 dias.



Nota: Teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) em condições de temperatura de geladeira após 30 dias. Os tubos continham concentrações de DNA de 100pg/  $\mu\text{L}$ , 100fg/  $\mu\text{L}$ , 1fg/  $\mu\text{L}$  e o controle negativo.

Fonte: O autor.

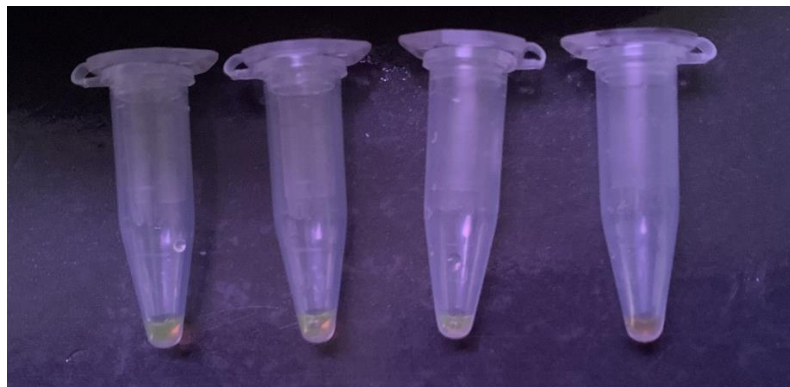
**Figura 10** – Análise do teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) após 60 dias.



Nota: teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) em condições de temperatura de geladeira após 60 dias. Os tubos continham concentrações de DNA de 100pg/  $\mu\text{L}$ , 100fg/  $\mu\text{L}$ , 1fg/  $\mu\text{L}$  e o controle negativo.

Fonte: O autor

**Figura 11** – Análise do teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) após 90 dias.



Nota: teste de estocagem do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) em condições de temperatura de geladeira após 60 dias. Os tubos continham concentrações de DNA de 100pg/  $\mu\text{L}$ , 100fg/  $\mu\text{L}$ , 1fg/  $\mu\text{L}$  e o controle negativo.

Fonte: O autor

### 7.3 Avaliação do desempenho do do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) na detecção específica do *Mtb* em amostras de expectoração

O do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) foi testado em 59 amostras de pacientes diagnosticados em tuberculose pulmonar (Grupo 1) e 44 amostras de pacientes diagnosticados sem tuberculose (Grupo 2), totalizando um N amostral de 103 pacientes.

Em relação ao desempenho do kit, foram avaliados valores de sensibilidade e especificidade. A sensibilidade encontrada foi de 98,28% e a especificidade foi de 95,56%. Também foram calculados os valores preditivos positivos (96,61%) e negativo (97,73%). A acurácia do kit também foi avaliada, tendo como resultado 97,09% (Tabela 4).

**Tabela 4-** Parâmetros de avaliação do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) na detecção do alvo *IS6110* para diagnóstico da tuberculose pulmonar.

Parâmetro	Cálculo	IC (95%)
Sensibilidade	98,26%	90.86 - 99.7
Especificidade	95,56%	85.17- 98.77
Valor Preditivo Positivo	96,61%	88.46 - 99.07
Valor Preditivo Negativo	97,73%	88.19 - 99.6
Acurácia	97,09%	91.78 - 99

Legenda: IC = Intervalo de Confiança

Fonte: O autor

Para avaliar o desempenho do kit comparado aos testes convencionais utilizados na prática clínica, também foram calculados valores de sensibilidade e especificidade isoladamente para cada tipo de teste (Baciloscopia, LAMP convencional e *GeneXpert*). Para os valores isolados de LAMP convencional, foi encontrada uma sensibilidade de 98,33% e especificidade de 100%. Em relação ao *GeneXpert*, foram obtidos valores de sensibilidade de 96,72% e especificidade de 100%. Para a baciloscopia, foi encontrada uma sensibilidade de 66.1% e uma especificidade de

100% (Tabela 5).

**Tabela 5-** Parâmetros de avaliação de comparação do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) na detecção do alvo *IS6110* com o LAMP convencional e *GeneXpert* para diagnóstico da tuberculose pulmonar.

Parâmetro	Cálculo	IC (95%)
<b>Baciloscopia</b>		
Sensibilidade	66.1%	(53.37, 76.86 <sup>1</sup> )
Especificidade	100%	(91.97, 100 <sup>1</sup> )
Valor Preditivo Positivo	100%	(91.03, 100 <sup>1</sup> )
Valor Preditivo Negativo	68.75 %	(56.61, 78.77 <sup>1</sup> )
Acurácia	80.58%	(71.9, 87.06 <sup>1</sup> )
<b>LAMP Convencional</b>		
Sensibilidade	98.33%	(91.14, 99.71 <sup>1</sup> )
Especificidade	100%	(91.8, 100 <sup>1</sup> )
Valor Preditivo Positivo	100%	(93.89, 100 <sup>1</sup> )
Valor Preditivo Negativo	97.73%	(88.19, 99.6 <sup>1</sup> )
Acurácia	99.03%	(94.7, 99.83 <sup>1</sup> )
<b>GeneXpert</b>		
Sensibilidade	96,72%	(88.81, 99.11)
Especificidade	100%	(91.62, 100 <sup>1</sup> )
Valor Preditivo Positivo	100%	(93.89, 100 <sup>1</sup> )
Valor Preditivo Negativo	95.45%	(84.86, 98.74 <sup>1</sup> )
Acurácia	98.06%	(93.19, 99.47 <sup>1</sup> )

Legenda: IC = Intervalo de Confiança

Fonte: O autor

## 8 DISCUSSÃO

A tuberculose ainda se apresenta como um problema de saúde pública e um dos grandes desafios da doença é a confirmação diagnóstica que permanece apresentando falhas na detecção do bacilo (OLIVEIRA et. al, 2021). Os métodos convencionais de identificação do *Mycobacterium tuberculosis* (baciloscopia e cultura) apresentam sensibilidade comprometida, o que leva a inúmeros casos de tuberculose sem confirmação (DOS SANTOS SILVA et. al, 2019).

A detecção do bacilo no início da infecção é primordial para um melhor prognóstico do paciente. Por isso, se observa a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de diagnósticos rápidos, sensíveis e que possuam baixo custo capazes de auxiliar os métodos considerados como convencionais, ou seja, métodos aplicados de rotina na clínica médica. (BAILEY, 2011; GEORGE, 2011; DOS SANTOS SILVA et. al, 2019). A técnica de LAMP é um método diagnóstico molecular, de elevada sensibilidade e especificidade, podendo ser promissora como uma nova ferramenta diagnóstica para a TB (GONÇALVES et al., 2014).

No estudo, foi avaliado o desempenho de um kit molecular baseado em LAMP em único tubo para detecção do alvo molecular *IS6110*. Inicialmente foram utilizadas as especificações descritas por Kohan et al., 2011. No entanto, nenhum ponto da curva de diluição utilizada na avaliação do limite de detecção se mostrou positivo ou possuiu amplificação inespecífica após a adição do *SYBR Green* na reação, indicando que não houve amplificação.

Com o intuito de otimizar a técnica, maximizar a reprodutibilidade e qualidade do ensaio, as especificações utilizadas inicialmente passaram pelo processo de modificação. As concentrações de alguns reagentes foram alteradas, sendo eles: betaína, dNTP e todos os primers (F3, B3, FIP, BIP, FLP, BLP). A enzima Bst DNA Polymerase Large Fragment® que foi utilizada no estudo de Kohan et al (2011) foi substituída pela Bst 2.0 WarmStart® DNA Polymerase e o reagente sulfóxido de dimetilo (DMSO) foi adicionado a reação, uma vez que o reagente tem a função de aumentar a estabilidade dessa enzima.

Kohan e colaboradores (2011) utilizaram, em seu estudo, betaína na concentração de 0.8M. A betaína é um composto responsável por trazer estabilidade as reações de LAMP e também de outras reações baseadas em PCR. Além disso, também é

responsável por aumentar a estabilidade da dupla fita de DNA, auxiliando na especificidade da reação e diminuindo as chances de amplificações inespecíficas (FRACKMAN et al, 1998; NOTOMI et al, 2000). Assim como a betaína, o DMSO é conhecido por aumentar a estabilidade das reações baseadas em amplificação de ácidos nucleicos (FRACKMAN et al, 1998). Segundo estudos de Kang e colaboradores (2005) e Jensen, Fukushima e Davis (2010), a utilização da betaína em associação ao DMSO aumenta consideravelmente a estabilidade da reação.

No presente estudo, não foi observada amplificação da técnica de LAMP apenas com o uso da betaína. Por isso, a adição do DMSO foi essencial quando utilizado junto com a betaína. A betaína foi testada em diversas concentrações que variou de 0,8M à 5M, sendo a última a concentração que apresentou melhores resultados.

No trabalho de Kohan e colaboradores (2011), foi utilizada a enzima Bst DNA polymerase, Large Fragment® (New England Biolabs), em uma concentração de 8U/  $\mu$ L. No presente estudo, a enzima foi substituída pela Bst 2.0 WarmStart® DNA Polymerase (New England Biolabs), em uma concentração de 5U/  $\mu$ L. Essa enzima é caracterizada por apresentar uma maior estabilidade, diminuindo as amplificações inespecíficas e aumentando a eficiência da reação (MORI; KANDA; NOTOMI, 2013).

Em seu estudo, Kohan e colaboradores (2011) utilizaram dois pares de primer: os primers internos (BIP e FIP), os primers que se hibridizam nas alças (BLP e FLP) e os primers externos (B3 e F3), nas concentrações de 1,6  $\mu$ M, 0,8  $\mu$ M e 0,2  $\mu$ M, respectivamente. No entanto, baseando-se em especificações presentes na literatura, como as descritas por Gandasegui e colaboradores (2018), foram testadas diferentes concentrações de primer, mantendo a proporção descrita por Kohan et al (2011) de 8:4:1 (Primers Internos : Primers do Loop : Primers Externos, respectivamente) afim de manter a nova padronização. Assim, as concentrações que melhor se adequaram ao nosso estudo foram: 40  $\mu$ M para os primers BIP e FIP, 20  $\mu$ M para os primers BLP e FLP e 5  $\mu$ M para os primers B3 e F3.

Após todas as alterações necessárias nas concentrações dos reagentes, a reação do kit de LAMP em único tubo amplificou nos pontos desejáveis e, com isso, foi possível ver, a reação quando positiva e quando negativa.

Para avaliar o limite de detecção do kit de LAMP em único tubo, foram utilizadas curvas de diluição do DNA genômico da cepa de referência H37Rv do



*Mycobacterium tuberculosis* em água miliq e amostra negativa de escarro para avaliar se algum componente presente na amostra poderia interferir no desempenho do kit.

A curva de diluição foi produzida utilizando concentrações do DNA gênomico da cepa de referência H37Rv do *Mycobacterium tuberculosis* sabidamente conhecidas e previamente dosadas em *nanodrop 2000* inicialmente em água MilliQ. A partir da concentração inicial, foram feitas diluições seriadas que variou de 100pg/  $\mu\text{L}$  à 1fg/  $\mu\text{L}$ . A curva de diluição nas amostra biológica de escarro foi realizada a partir de um controle negativo (amostra sabidamente negativa com exames laboratoriais convencionais e moleculares negativos de paciente sem TB) que foi submetido ao processo de extração de DNA. A amostra extraída foi contaminada com uma alíquota de DNA da cepa de referência H37Rv do *Mtb*, de concentração conhecida, também previamente dosada em *nanodrop 2000*. A partir da concentração inicial, foram feitas diluições, na proporção de 1:10, variando de 100pg/  $\mu\text{L}$  à 1fg/ $\mu\text{L}$ .

Sabe-se que o genoma de um único bacilo do complexo *Mtb* é equivalente a aproximadamente 5fg de DNA (ARYAN et al., 2009; PANDEY et al., 2008). Em todas as curvas de diluição analisadas em nosso estudo (água Milli-Q e escarro), o limite de detecção obtido foi de 1fg/  $\mu\text{L}$ . Logo, baseando-se nesses achados, o kit de LAMP em único tubo foi capaz de detectar fragmentos do bacilo contendo o alvo molecular *IS6110* por  $\mu\text{L}$  de amostra.

Kohan e colaboradores (2011) encontraram, inicialmente, um limite de detecção de 25fg/  $\mu\text{L}$  para o alvo *IS6110*, sendo maior que o obtido no presente estudo. Entretanto, após realizar uma desnaturação inicial do DNA molde, a uma temperatura de 95°C por 3 min, o novo limite encontrado foi de 5fg/ $\mu\text{L}$  (KOHAN et al, 2011). Resultado semelhante (5fg/  $\mu\text{L}$ ) pôde ser observado em um estudo indiano, entretanto, a reação foi otimizada para detecção do alvo molecular *esat6* (KUMAR et al, 2014).

Outros trabalhos encontrados na literatura buscaram avaliar o limite de detecção do LAMP para diagnóstico da tuberculose. Um estudo desenvolvido por Balne et al (2015), que tinha como objetivo comparar as técnicas de LAMP, PCR convencional e PCR em tempo real, encontrou um limite de detecção de 10fg/  $\mu\text{L}$ , porém a reação foi utilizada para detecção do alvo MPB64 (BALNE et al, 2015). Entretanto, em um estudo elaborado por Yang e colaboradores (2011), para o alvo *IS1081* o limite de detecção encontrado foi de 1pg/  $\mu\text{L}$  (YANG et al, 2011).

Após a avaliação do limite de detecção do kit de LAMP em um único tubo com todas as alterações necessárias para amplificação do produto, analisou-se as condições de estocagem e controle de qualidade dos reagentes e do kit. O kit foi armazenado à 4°C com a finalidade de avaliar sua durabilidade com relação à temperatura ambiente. Essa análise foi feita por um total de 90 dias da seguinte maneira: após 24 horas do início de armazenamento, com 15, 30, 60 e 90 dias de estocagem do kit.

Para avaliar os resultados do armazenamento e seu controle de qualidade, foram utilizadas curvas de diluição do DNA do *Mycobacterium tuberculosis* em escarro, que variou de 100pg/ µL à 1fg/ µL, semelhante a curva de diluição utilizada para observar o limite de detecção. Em todas as avaliações, o resultado da estocagem e armazenamento na temperatura de geladeira (4°C) foi de 1fg/ µL. Neste contexto e diante dos resultados encontrados, pode-se concluir que mesmo após 90 dias de estocagem dos reagentes a 4°C (geladeira), os reagentes mantiveram sua estabilidade do kit de LAMP em um único tubo conservadas, conseqüentemente não alteraram o desempenho do kit de LAMP em um único tubo. Desta forma, na etapa de avaliação do kit e necessidade de distribuição nos serviços de saúde, o mesmo poderá ser armazenado na geladeira a uma temperatura de 4°C.

No estudo de Chen e colaboradores (2016) foi feita uma estocagem à 4°C, 25°C e 37°C onde puderam obter um ensaio de LAMP capaz de detectar cerca de 25 cópias do alvo molecular para *Coxiella* à 4°C. Foi visto que a medida que a temperatura de armazenamento aumentou, a capacidade de amplificação diminuiu, tornando-se uma variável inversamente proporcional. Além disso, em locais tropicais onde a temperatura média varia em torno de 30°C, foi visto que o kit poderia estar viável em até 42 dias.

Outro estudo também desenvolvido pelo Chen e colaboradores (2016) avaliou as condições de estocagem dos reagentes do LAMP para detecção do DNA da leptospira. Os reagentes permaneceram estáveis quando armazenados à 4°C por três meses, semelhante encontrado no presente estudo, e 1 mês quando armazenado à 25°C. Não foram encontrados estudos envolvendo *Mycobacterium tuberculosis*.

No estudo, os pacientes que foram incluídos na pesquisa foram subdividido em dois grupos de acordo com o seu diagnóstico final: Grupo 1: Pacientes com tuberculose e Grupo 2: Pacientes sem tuberculose (grupo controle). Ambos os grupos foram avaliados de acordo com as principais características clínico-epidemiológicas,

sendo o diagnóstico realizado pelo médico de cada serviço de saúde (vide metodologia).

Devido ao número pequeno de indivíduos selecionados e de amostras de escarro testadas faz-se necessário, uma etapa posterior de avaliação, com um  $n$  amostral maior, para obtenção de resultados mais fidedignos e significantes, levando em consideração o excelente desempenho do LAMP em um único tubo obtido nesse estudo.

Foi demonstrado no estudo, um ótimo desempenho do kit molecular baseado em LAMP em um único tubo, na detecção do alvo *IS6110* em amostra biológica de expectoração, com sensibilidade de 98,28% e especificidade de 95,56% inclusive com valores iguais ou melhores em relação à vários testes descritos na literatura para a detecção de TB.

De acordo com a literatura, métodos de diagnósticos com elevada sensibilidade apresentam uma maior probabilidade de identificar a doença, utilizados, principalmente, para excluir hipóteses diagnósticas. Testes sensíveis são recomendados em casos onde o diagnóstico incorreto pode interferir negativamente no prognóstico de pacientes com doenças sérias, mas que possuam tratamento eficaz, como é o caso da tuberculose (MENEZES, 1999).

Yan et al., (2019) realizou um estudo utilizando 133 casos hospitalizados com suspeita de tuberculose ativa associada à pneumoconiose. Dos 133 pacientes com suspeita de tuberculose, 37,59% foram positivos no GeneXpert MTB/RIF, 34,59% foram positivos no BACTEC-MGIT 960 e 30,08% foram positivos na cultura de Lowenstein-Jensen (LJ). A sensibilidade do GeneXpert MTB/RIF utilizando os alvos moleculares *IS6110* e *rpoB* e BACTEC-MGIT 960 na detecção do bacilo foi de 92,5% e 95,0%, respectivamente, semelhante ao do presente estudo.

No estudo de TANG et al., (2017) foi avaliado o desempenho do GeneXpert MTB RIF onde utilizou 240 amostras de pacientes com suspeita de tuberculose. dessas 240, a taxa de positividade foi de 36,6% (87/238) para o ensaio do GeneXpert MTB RIF. Quando comparado com a cultura, a sensibilidade do GeneXpert utilizando os alvos moleculares *IS6110* e *rpoB* foi de 84,0% (68/81), relativamente inferior ao teste do presente estudo.

YADAV et al., (2017), realizaram um estudo que visava avaliar o desempenho de

um kit molecular comercial baseado em LAMP para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. 530 pacientes com sintomas de tuberculose pulmonar foram submetidos ao processo de coleta de amostra de expectoração e diagnóstico pelo kit Loopamp™ MTBC Detection. A sensibilidade e especificidade para o kit Loopamp™ MTBC Detection foi de 100% e 99,2% respectivamente, sendo superior a encontrada em nosso estudo, entretanto, não foi indicado pelos autores qual o alvo molecular utilizado.

RAKOTOSAMIMANANA et al., (2019), avaliou o desempenho do Loopamp MTBC Detection Kit® na detecção do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* em 548 amostras de expectoração. A sensibilidade do teste foi de 84% e a especificidade foi de 98,4%, bastante distinto ao que foi encontrado no presente trabalho. O alvo molecular utilizado para detecção do complexo foi o *gyrB*, o que pode ter impactado nesses resultados.

Conforme foi observado, existe uma pequena variedade de valores de sensibilidade e especificidade nos trabalhos obtidos na literatura. Nesse contexto, alguns resultados podem ter sido impactados por refletir na escolha do alvo molecular como também em amostras viáveis para o teste.

Em relação aos alvos moleculares, foi visto que o *IS6610* foi bastante utilizado. Esse elemento de inserção apresenta um elevado número de cópias ao longo do genoma do bacilo, possuindo uma elevada especificidade às cepas do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo ideal para estudos de diagnósticos por apresentar um alto potencial de identificação do microorganismo. Por isso, optou-se, no presente estudo, por esse alvo (ROYCHOWDHURY, MANDAL, BHATTACHARYA, 2015).

Além do alvo molecular, o padrão de referência utilizado também pode interferir nos resultados de sensibilidade e especificidade. Sabe-se que novos diagnósticos são frequentemente comparados com métodos já utilizados na prática clínica, conhecidos como padrão-ouro. (VALENSTEIN, 1990; REITSMA et al, 2009). Segundo preconizado pelo Ministério da Saúde, o padrão-ouro utilizado no diagnóstico da tuberculose, seja na forma pulmonar ou extrapulmonar, é a cultura de micobactérias (BRASIL, 2008).

Nesse trabalho, foi utilizado um padrão de referência composto, onde consistiu no diagnóstico da tuberculose pulmonar através das análises clínicas-epidemiológicas,

métodos diagnósticos convencionais para tuberculose como baciloscopia e *GeneXpert MTB/RIF*. Além disso, também foi feito o LAMP convencional.

Para fins de avaliação do desempenho do kit, foram calculados valores de sensibilidade e especificidade isoladamente para cada tipo de teste comparado. Em relação ao *GeneXpert*, foram obtidos valores de sensibilidade de 98,33% e especificidade de 100%. Para o LAMP convencional, foi encontrada uma sensibilidade e uma especificidade de 96,72% e 100%, respectivamente. Já para a baciloscopia, foi encontrada uma sensibilidade de 66,1% e uma especificidade de 100%.

A utilização de amostras de fácil obtenção, como escarro, em métodos moleculares, é capaz de garantir um resultado rápido e preciso, evitando o internamento do paciente e intercorrências mais agressivas (REBOLLO et al, 2006).

Apesar da baciloscopia possuir um baixo custo (cerca de R\$14,00 reais) quando comparada às outras técnicas convencionais de diagnóstico, o tempo que se libera um resultado pode demorar cerca de 1h por conta da preparação do esfregaço, coloração e leitura propriamente dita da lâmina. Já o *GeneXpert*, além de se tratar de um ensaio caro (cerca de R\$165,00), o resultado estará presente apenas após 1:30 de incubação em máquina. No entanto, o kit de LAMP em único tubo permite que o resultado, ou seja, a identificação ou não do bacilo na amostra de expectoração, saia em torno de 40 minutos, sendo mais rápido que todos os métodos citados acima. O tempo mais rápido obtido na execução do LAMP único tubo, representa uma vantagem muito importante para os serviços de referência no diagnóstico da tuberculose, os quais recebem inúmeras amostras de escarro diariamente o que dificulta a liberação precoce dos resultados, levando ao retardo do tratamento específico.

Apesar dos custos referentes ao LAMP convencional e ao de um único tubo, serem semelhantes (R\$25,00) como também seus desempenhos, observou-se que o kit LAMP em único tubo apresenta uma maior praticidade de execução, visto que não exige uma etapa pré-analítica de alíquotagem de reagente para a corrida, levando, conseqüentemente, um tempo menor para a liberação dos resultados.

O kit molecular baseado em LAMP em único tubo para detecção do alvo *IS6110* realizado em nosso estudo mostrou resultados promissores de desempenho e praticidade na sua execução. Devido a elevada sensibilidade e excelente capacidade

de detecção do DNA genômico do *Mtb*, é importante considerar o uso desse método, associado à outros testes convencionais, para se conseguir maior detecção de casos de TB e precisão no diagnóstico final, que certamente levarão ao tratamento precoce e melhor prognóstico para os pacientes com tuberculose, sobretudo nas populações mais vulneráveis dos países em desenvolvimento.

## 9 CONCLUSÃO

- a) O kit de LAMP em único tubo se mostrou eficaz na detecção do *Mycobacterium tuberculosis* após alterações de protocolo, amplificando o alvo molecular *IS6110*, tendo como limite de detecção 1fg/ $\mu$ L.
- b) Após análise de estocagem e controle de temperatura, o kit de LAMP em único tubo consegue ficar armazenado por, pelo menos, três meses em geladeira (4°C) sem nenhuma alteração de desempenho.
- c) O kit de LAMP em único tubo obteve um bom desempenho na detecção do *Mycobacterium tuberculosis*, apresentando elevada sensibilidade (98,28%) em amostra biológica de expectoração de indivíduos com tuberculose pulmonar.
- d) Devido à sua elevada sensibilidade, praticidade e tempo de execução reduzido, o kit tem um excelente potencial de diagnóstico, auxiliando os métodos convencionais no intuito de detectar um maior número de casos de TB, resultando em um tratamento precoce e com melhor prognóstico sobretudo em regiões onde a tuberculose é endêmica, como no Brasil.

## REFERÊNCIAS

ARYAN, Ehsan et al. A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting *IS6110* for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Microbiological research**, v. 165, n. 3, p. 211-220, 2010.

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

BRATS: Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Brasília, DF: ANVISA, ano 6, n. 16, set. 2011. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/brats\\_16.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/brats_16.pdf)>. Acesso em: 07 jan.2022.

BUSATTO, Caroline et al. Tuberculose ativa versus Tuberculose Latente: uma revisão de literatura. **Journal of Infection Control**. Santa Cruz do sul, v. 4, n. 3, 2015.

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

DE SOUZA MACIEL, Marina et al. A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria. São Paulo, **Revista Societad Bras Clín Méd**, v. 10, n. 3, p. 226-30, 2012.

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

GLAZIOU, Philippe et al. Global epidemiology of tuberculosis. **Semin. Respir. Crit. Care Med**, New York, v. 34, n. 1, p. 3-16, 2013.

GUIMARÃES, Ana Beatriz Giles et al. A HISTÓRIA DA TUBERCULOSE ASSOCIADA AO PERFIL SOCIOECONOMICO NO BRASIL: UMA REVISÃO DA LITERATURA. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde- FCIPE**, Recife, v. 3, n. 3, p. 43, 2018.



HIJJAR, Miguel 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. 310-4, 2005.

HOUSTON, A.; MACALLAN, D. Extrapulmonary tuberculosis. **Medicine**, London, v. 42, n. 1, p. 18–22, 2014.

JANSEN, José Manoel; CAPONE, Domenico; LOPES, Agnaldo José. A tuberculose nos primeiros anos do século XXI. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto (TÍTULO NÃO-CORRENTE)**, v. 5, n. 2, 2006.

KOHAN, L. et al. Evaluation of loop mediated isothermal amplification for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 26, p. 5096-5101, 2011.

KOZAKEVICH, Gabriel; DA SILVA, Rosemeri. Tuberculose: revisão de literatura. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, Santa Catarina, v. 44, n. 4, p. 34-47, 2015.

LACERDA, H. et al. Evaluation of a Nested-PCR for *Mycobacterium Tuberculosis* Detection in Blood and Urine Samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, Recife, v. 42, p. 321–329, 2011.

LIMA, Taiza Maschio de et al. Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, São José do Rio Preto, v. 8, n. 2, p. 65-76, 2017.

MCCLARY, J. et al. Sequencing with the large fragment of DNA polymerase I from *Bacillus stearothermophilus*. **DNA Sequence**, v. 1, n. 3, p. 173-180, 1991.

MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. **Journal of Infection and Chemotherapy**. v. 15, n. 2, p. 62-69, 2009.

NEONAKIS, I.K. et al. Use of loop-mediated isothermal amplification of DNA for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 8, p. 937-942, 2011.

NEONAKIS, Ioannis K.; SPANDIDOS, Demetrios A.; PETINAKI, Efthimia. Use of loop-mediated isothermal amplification of DNA for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 30, n. 8, p. 937-942, 2011.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acid Res.** v. 28, n. 12, 2000.

NUNES, Mariana de Lira et al. **Aplicação da técnica Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) no desenvolvimento de um teste para o diagnóstico da peste**. 2013. Tese de Doutorado.

PARIDA, Manmohan et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in medical virology**, v. 18, n.6, p. 407-421, 2008.

PEDRO, Heloisa da Silveira Paro. Diversidade clínica, epidemiológica e Genética do *Mycobacterium tuberculosis* na região Noroeste paulista. **Tese (Doutorado)** - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2015.

PUROHIT, Manju; MUSTAFA, Tehmina. Laboratory diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis (EPTB) in resource-constrained setting: state of the art, challenges and the need. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 9, n. 4, p. EE01, 2015.

QIAAMP, D. N. A. Mini and Blood Mini Handbook. **Qiagen**,, 2016.

ROYCHOWDHURY, Tanmoy; MANDAL, Saurav; BHATTACHARYA, Alok. Analysis of *IS6110* insertion sites provide a glimpse into genome evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

ROYCHOWDHURY, Tanmoy; MANDAL, Saurav; BHATTACHARYA, Alok. Analysis of *IS6110* insertion sites provide a glimpse into genome evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Scientific reports**, Nova Delhi, v. 5, 2015.

RUFAl, SyedBeenish et al. Performance of Xpert MTB/RIF assay in diagnosis of pleural tuberculosis by use of pleural fluid samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 11, p. 3636-3638, 2015.

TOMITA, N. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature Protocols**, v. 3, p. 877-882, 2008.  
WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global tuberculosis report 2017. 2017.

DOS SANTOS SILVA, Natally. Análise comparativa da técnica de baciloscopia no diagnóstico da tuberculose pulmonar frente ao GeneXpert em amostras de pacientes da cidade de Recife, Pernambuco. **RBAC**, v. 51, n. 1, p. 65-9, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual Nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**, 2008.

RAKOTOSAMIMANANA, Niaina et al. Performance and impact of GeneXpert MTB/RIF® and Loopamp MTBC Detection Kit® assays on tuberculosis case detection in Madagascar. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2019.

YADAV, R. et al. Evaluation of the TB-LAMP assay for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis in Northern India. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 21, n. 10, p. 1150-1153, 2017.

TANG, Tingyu et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for detecting Mycobacterium tuberculosis in a hospital in China. **Journal of international medical research**, v. 45, n. 2, p. 816-822, 2017.

CHEN, Hua-Wei; CHING, Wei-Mei. The development of lyophilized loop- mediated isothermal amplification reagents for the detection of Coxiella burnetii. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 110, p. e53839, 2016

CHEN, Hua-Wei; WEISSENBERGER, Giulia; CHING, Wei-Mei. Development of lyophilized loop-mediated isothermal amplification reagents for the detection of Leptospira. **Military Medicine**, v. 181, n. suppl\_5, p. 227-231, 2016.

JIN, Yan et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF and BACTEC-MGIT 960 for the detection of tuberculosis among pneumoconiosis-associated tuberculosis patients. **Zhonghua lao Dong wei Sheng zhi ye Bing za zhi= Zhonghua Laodong Weisheng Zhiyebing Zazhi= Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases**, v. 37, n. 9, p. 690-693, 2019

REITSMA, Johannes B. et al. A review of solutions for diagnostic accuracy studies with an imperfect or missing reference standard. **Journal of clinical epidemiology**, v. 62, n. 8, p. 797-806, 2009.

VALENSTEIN, Paul N. Evaluating diagnostic tests with imperfect standards. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 93, n. 2, p. 252-258, 1990.

ZUMLA, Alimuddin; NAHID, Payam; COLE, Stewart T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nature reviews Drug discovery**,

v. 12, n. 5, p. 388-404, 2013.

ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa et al. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Revista de Saúde Pública*, v. 36, p. 525-532, 2002.

KAUR, Indu Pal; SINGH, Harinder. Nanostructured drug delivery for better management of tuberculosis. *Journal of Controlled Release*, v. 184, p. 36-50, 2014.

KOLYVA, Anastasia S.; KARAKOUSIS, Petros C. Old and new TB drugs: mechanisms of action and resistance. *Understanding Tuberculosis-New approaches to fighting against drug resistance*, 2012.

VASAVA, Mahesh S. et al. Drug development against tuberculosis: past, present and future. *Indian Journal of Tuberculosis*, v. 63, n. 3, p. 252-275, 2017.

PALOMINO, Juan-Carlos et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

## APÊNDICE A – PROTOCOLO DE PESQUISA DE TUBERCULOSE

### PROTOCOLO DE PESQUISA DE TUBERCULOSE

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

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

<b>38. RESULTADO DO PPD:</b> <input type="checkbox"/> 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		<b>39. TOMA ALGUM MEDICAMENTO ATUALMENTE?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não Qual: _____	
<b>40. JÁ FEZ TTO PARA TUBERCULOSE?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> Qual: _____ 2. Não Caso sim, há quanto tempo parou o TTO? _____ Caso sim, número de TTO anteriores: _____			
<b>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (referidos pelo Informante)</b>			
<b>41. HÁ QUANTO TEMPO O PACIENTE ESTÁ DOENTE?</b> <input type="text"/> <input type="text"/> meses <input type="text"/> <input type="text"/> dias		<b>42. TEM FEBRE?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe Caso sim, há quanto tempo: _____	
<b>44. TEM TOSSE?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe Caso sim, há quanto tempo: _____		<b>45. TIPO DE TOSSE:</b> 1. Seca <input type="checkbox"/> 2. Produtiva 3. Hemoptise 9. Inaplicável	
<b>47. TEM FRAQUEZA MUSCULAR?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe		<b>46. TEM FALTA DE APETITE?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe	
<b>50. NOTOU LINFONODO (LÂNDRIA OU ÍNGUA) AUMENTADO?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe		<b>48. APRESENTA FALTA DE AR DESDE QUE FICOU DOENTE?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe	
<b>51. LOCAL DO LINFONODO:</b> 1. Pescoço <input type="checkbox"/> 2. Axila 3. Região inguinal (virilha) Outros _____		<b>49. APRESENTA SUOR NOTURNO?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe	
<b>50. OBSERVAÇÕES CLÍNICAS:</b> _____ _____ _____			
<b>INVESTIGAÇÃO CLÍNICA (preenchida pelo médico acompanhante)</b>			
<b>MÉDICO RESPONSÁVEL:</b> _____		<b>FONE:</b> ( ) _____ - _____	
<b>52. PESO</b> _____ Kg		<b>53. ESTATURA</b> _____ m	



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

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

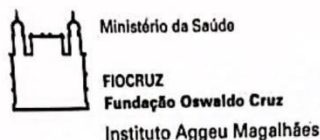
<b>DIAGNÓSTICO MOLECULAR</b>			
<b>71. REALIZOU NESTED-PCR ÚNICO TUBO PRÉ-TRATAMENTO?</b>	<b>72. RESULTADO POR AMOSTRA BIOLÓGICA (NESTED-PCR ÚNICO TUBO):</b>		
1. Sim <input type="checkbox"/>	1. <input type="checkbox"/> Leucócitos	6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural	<b>1. Sim</b>
2. Não <input type="checkbox"/>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

RESPONSÁVEL PELO PREENCHIMENTO DA FICHA: \_\_\_\_\_

TELEFONE PARA CONTATO: ( ) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ / ( ) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

RESPONSÁVEL PELOS EXAMES MOLECULARES: \_\_\_\_\_

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



### Anexo 1

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Título do Projeto de Pesquisa:** Desenvolvimento de um kit baseado em amplificação isotérmica de DNA mediada por Loop (LAMP-PCR) em único tubo para o diagnóstico da tuberculose pulmonar

Convidamos o Senhor (a) para participar como voluntário do projeto de pesquisa "Desenvolvimento de um kit baseado em amplificação isotérmica de DNA mediada por Loop (LAMP-PCR) em único tubo para o diagnóstico da tuberculose pulmonar" que será desenvolvido no Instituto Aggeu Magalhães, uma unidade da Fundação Oswaldo Cruz, localizada em Pernambuco (IAM/FIOCRUZ).

Esta pesquisa tem como objetivo estudar desenvolver uma nova metodologia de diagnóstico molecular para tuberculose pulmonar.

Caso aceite participar, será realizada uma coleta de 4mL de escarro, através de tosse forçada, utilizando um pote descartável de plástico, de boca larga e tampa rosqueável. As coletas de escarro serão feitas pelo coordenador ou por uma das colaboradoras da pesquisa. Através da coleta do seu escarro será avaliado se esse novo ensaio é eficaz na detecção do *Mycobacterium tuberculosis*.

A coleta de escarro é segura, mas pode causar um pequeno desconforto durante e/ou após a tosse. O risco relacionado a participação é mínimo de constrangimento ao responder as perguntas da ficha clínica e não será necessário realizar novas coletas. Garantimos, contudo, que todos os nossos esforços estarão direcionados para que situações de constrangimento não ocorram, e que os riscos descritos sejam minimizados, através de os seguintes direitos: a garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta; a liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para si; a garantia da privacidade e sigilo das suas informações.

Essa pesquisa traz como benefício proporcionar aos serviços de saúde um kit de diagnóstico molecular de baixo custo, rápido, prático e reproduzível, auxiliando no diagnóstico precoce da tuberculose e contribuindo para erradicação da cadeia de transmissão e, conseqüentemente, no controle da doença.

Caso aceite participar, irá contribuir para o desenvolvimento do projeto na parte biológica. Através dos dados obtidos, poderemos entender melhor os processos envolvidos no diagnóstico das formas de tuberculose e, dessa forma, essa pesquisa servirá de base no desenvolvimento de melhores abordagens na prevenção, tratamento, diagnóstico e prognóstico da doença. Será garantido aos participantes o acesso aos resultados da pesquisa, assim como aos laudos das análises laboratoriais.

Todas as informações e explicações serão fornecidas pelo pesquisador e qualquer alteração deverá ser comunicada ao pessoal responsável que verificará a necessidade de cuidados adicionais.

Caso aceite participar da pesquisa, o (a) senhor (a) não será obrigado a ficar até o final, pode desistir a qualquer momento, sem prejuízo ou sofrer quaisquer sanções ou constrangimentos. O senhor (a) poderá se recusar e/ou retirar este consentimento a qualquer momento que desejar, sem prejuízo a ambas as partes. Todos os seus dados também serão removidos da pesquisa, a não ser que o Sr (a) autorize a permanência desses na nossa análise.

A sua participação será por livre e espontânea vontade e, diante disso, o (a) senhor (a) será ressarcido caso tenha qualquer despesa. O (a) senhor (a) não receberá qualquer incentivo financeiro, a finalidade exclusiva vai ser de colaborar com a pesquisa. É garantido o direito a indenização diante de danos decorrentes da pesquisa.

Todas as informações fornecidas estão submetidas às normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade. O acesso e a análise dos dados coletados se farão apenas pelos pesquisadores envolvidos no projeto. Os resultados também poderão ser publicados em revistas e apresentados em eventos científicos. As amostras ficarão armazenadas no laboratório de imunopidemiologia até o fim da pesquisa (março de 2022). Caso o senhor(a) concorde, existe a possibilidade de suas amostras serem usadas em pesquisas futuras. Para isso, iremos entrar em contato e haverá um novo consentimento, assegurar acesso aos resultados da pesquisa.

Caso precise de algum esclarecimento, entrar em contato a qualquer momento que julgar necessário com o coordenador Danyele Costa de Mello, através do telefone (81) 2101-2569 ou do e-mail: [danyelecmello@gmail.com](mailto:danyelecmello@gmail.com). Em caso de reclamações, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

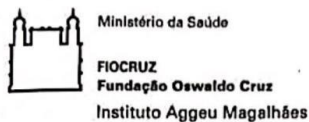
do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE) através do e-mail: [cep.iam@fiocruz.br](mailto:cep.iam@fiocruz.br) e/ou telefone (81) 2101-2500, de segunda à sexta-feira, das 8h00 às 17h00.

\_\_\_\_\_  
(Rúbrica do participante da pesquisa)

\_\_\_\_\_  
(Rúbrica do Coordenad

Página 2 de 3

Av. Prof. Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária – Campus da UFPE, Recife – PE. CEP. 50.740-465  
Telefone: (81) 2101.2500 / 2101.2600. E-mail: [cep.iam@fiocruz.br](mailto:cep.iam@fiocruz.br) [www.cpqam.fiocruz.br](http://www.cpqam.fiocruz.br)



Eu, \_\_\_\_\_ aceito participar da pesquisa "Desenvolvimento de um kit baseado em amplificação isotérmica de DNA mediada por Loop (LAMP-PCR) em único tubo para o diagnóstico da tuberculose pulmonar" e concordo com os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa. Atesto que assinei duas vias do termo de consentimento com informações iguais e fiquei com uma via.

Recife, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do participante da pesquisa)

Nome do participante: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Assinatura da Coordenadora)

Nome da Coordenadora: \_\_\_\_\_

OBS: O Termo de Consentimento será emitido em duas vias, uma para o paciente e outra para o pesquisador. Todas as páginas devem ser rubricadas e numerada

Em caso de dúvidas, você pode procurar o coordenador: Danyele Costa de Mello, e as colaboradoras, Dra Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel, Dra Haiana Charifker Schindler, Dra Rosana de Albuquerque Montenegro, Kessia Kelly Batista da Silva, Renata Inglez de Sousa Tejo e Giovanna Gabriela Pedroza no Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ- PE. Av. Prof<sup>o</sup> Moraes Rego, S/N. Campus da UFPE. Recife/PE.  
E-mail: danyelecmello@gmail.com

Telefone: 81 2101-2569

Página 3 de 3

Av. Prof. Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária – Campus da UFPE, Recife – PE. CEP. 50.740-465  
Telefone: (81) 2101.2500 / 2101.2600. E-mail: cep.iam@fiocruz.br www.cpqam.fiocruz.br

## ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



**INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)**



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento de um kit baseado em amplificação isotérmica de DNA mediada por Loop (LAMP-PCR) em único tubo para o diagnóstico da tuberculose pulmonar

**Pesquisador:** DANYELE COSTA DE MELLO

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 51761021.5.0000.5190

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.238.453

#### Apresentação do Projeto:

As informações dos campos Apresentação do Projeto, Objetivo da Pesquisa e Avaliação dos Riscos e Benefícios foram retiradas do documento PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1780319.pdf de 13.09.2021, cujo preenchimento foi realizado pela pesquisadora responsável.

Trata-se de projeto de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do IAM.

#### Resumo:

A confirmação diagnóstica da tuberculose continua sendo um desafio diário, devido a carência de testes laboratoriais que apresentem boa sensibilidade na detecção do bacilo, o que é imprescindível na elucidação dos casos. Na maioria das vezes, a confirmação diagnóstica da tuberculose é estabelecida através da combinação de diferentes métodos, o que consome tempo e inviabilizam um tratamento adequado de imediato. Ainda assim, quando a identificação laboratorial não é conclusiva, a confirmação é feita por meio da associação de critérios clínicos, epidemiológicos e resposta a terapêutica específica. Em virtude de os métodos laboratoriais tradicionais apresentarem falhas, sendo um dos principais fatores que contribui para a manutenção dos elevados índices da doença no mundo, ou possuem um elevado custo, técnicas

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-420

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2101-2639

**Fax:** (81)2101-2639

**E-mail:** cep.iam@fiocruz.br



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 5.238.453

moleculares baseadas em LAMP vêm se destacando por sua rapidez, especificidade e sensibilidade, o que trouxe enormes perspectivas para o diagnóstico e detecção de agentes infecciosos. Em função de suas qualidades e constante evolução, o ensaio tem possibilitado grandes avanços em diversas áreas de conhecimento, sobretudo no diagnóstico da tuberculose. Os resultados obtidos, até o presente momento, com a técnica de LAMP podem gerar uma proposta de um novo kit de diagnóstico para TB, o LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR), podendo ser introduzido no mercado nacional, além de conseguir ser utilizado a nível primário, secundário e terciário de saúde na rede SUS. Em termos de custo por reação, o LAMP é aproximadamente 53,92% mais barato em relação à PCR convencional. Se o custo do equipamento também estiver incluído, o LAMP torna-se comparativamente ainda mais acessível, uma vez que pode ser realizada utilizando apenas um banho maria ou um termobloco. Desta forma, o kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR), por tratar-se de uma ferramenta simples, prática, sensível e reprodutível, permitirá identificação precoce do Mtb, interferindo na cadeia de transmissão do bacilo e, conseqüentemente, no controle da doença. Além disso, a possibilidade de um kit de diagnóstico rápido e eficaz certamente poderá contribuir no planejamento de ações específicas, conjuntas e articuladas, impactando na melhoria dos programas de controle da TB, em uma maior descoberta dos casos e auxílio aos métodos tradicionais para confirmação da doença.

#### Hipótese:

O KIT molecular baseado em LAMP em um único tubo possui acurácia na detecção do Mycobacterium tuberculosis para o diagnóstico da tuberculose pulmonar.

#### Metodologia Proposta:

Com o intuito de maximizar o prazo de validade do kit, os reagentes do LAMP em único tubo serão suplementados com sacarose e liofilizados. Para avaliar a estabilidade e sua durabilidade, o kit será, inicialmente, armazenado em diferentes temperaturas (-20°C, 4°C, 25°C e 37°C), desde uma temperatura relativamente fria à uma temperatura que represente as condições de calor excessivo. Essa análise será realizada no dia zero até 365 dias (12 meses). A análise da estabilidade dos reagentes liofilizados, estocados nas temperaturas descritas acima, será avaliada em um período mínimo de 12 meses. Inicialmente, um ensaio será realizado no primeiro dia, outro após 15 dias e um terceiro após 30 dias. Posterior a isso, serão feitas análises mensais até o décimo segundo mês. Para avaliar e definir o limite de detecção do KIT LAMPLIUTT-PCR, será feita uma curva de

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: cep.iam@fiocruz.br





INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 5.238.453

diluição de DNA do Mtb, da cepa de referência H37Rv, inicialmente em água MilliQ®, na proporção de 1:10, variando de 10ng/μL à 1fg/μL. A curva de diluição nas amostras biológicas será realizada a partir de um controle negativo (amostra sabidamente negativa com exames laboratoriais convencionais e moleculares negativos de paciente sem TB) submetido ao processo de extração de DNA. A amostra extraída será contaminada com uma alíquota de DNA da cepa de referência H37Rv do Mtb, de concentração conhecida, previamente dosada em nanodrop 2000. A partir da concentração inicial, será feita a diluição, na proporção de 1:10, variando de 10ng/μL à 1fg/μL. Para avaliação do desempenho do kit, os pacientes participantes da pesquisa serão divididos em dois grupos: Grupo TB e Grupo sem TB. As amostras biológicas serão processadas conforme descrito no Manual Nacional de Vigilância da Tuberculose e outras Micobactérias, 2008. A extração e purificação do DNA das amostras biológicas será realizada seguindo o protocolo do kit QIAamp DNA MiniKit (Qiagen). O tamanho da amostra para avaliação de acurácia de testes (FLAHAULT et al., 2005) considerando uma sensibilidade e especificidade de 85% e um erro máximo tolerável de 5%, seriam necessários 100 indivíduos em cada grupo, com 95% de confiança, 80% de poder do teste, com uma Odds Ratio mínima a ser detectada de 2 e um percentual de exposição de 20% entre os controles. Para a avaliação do desempenho e da confiabilidade do kit, serão utilizados, como padrões de comparação, os seguintes testes: a PCR em tempo real, o LAMP convencional e um padrão de comparação composto (critérios clínico-epidemiológicos, resposta ao tratamento específico e os resultados de outros testes laboratoriais). Os dados serão analisados em termos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e eficiência, com intervalos de confiança de 95%. Adicionalmente serão utilizados o teste qui-quadrados e o coeficiente de concordância Kappa. A análise será realizada no software estatístico SPSS v 8.0 com nível de significância no valor de 5%.

**Critério de Inclusão:**

Para o Grupo TB: pacientes com evidências clínicas e epidemiológicas e diagnóstico confirmado bacteriologicamente através dos exames de baciloscopia, cultura, raio X de tórax ou o teste molecular GeneXpert MTB/RIF. Para o Grupo sem TB: Pacientes sem TB que procuraram o serviço de saúde por outra doença, com quadro clínico e laboratorial não compatível com a TB e epidemiologia negativa para TB.

**Critério de Exclusão:**

Paciente menor de 18 anos.

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-420

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2101-2639

**Fax:** (81)2101-2639

**E-mail:** cep.iam@fiocruz.br



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 5.238.453

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Desenvolver um kit baseado em amplificação isotérmica de DNA mediada por Loop (LAMP-PCR) em único tubo para o diagnóstico da tuberculose pulmonar.

Objetivos secundários:

- Padronizar as condições de liofilização dos reagentes do LAMP para o kit em único tubo (KITLAMPLIUTTPCR);
- Avaliar, em condições controladas de estocagem, por um período máximo de 12 meses, a estabilidade do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR);
- Avaliar o limite de detecção do kit de LAMP em um único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) com reagentes liofilizados utilizando concentrações conhecidas de DNA genômico da cepa de referência H37Rv do Mycobacterium tuberculosis;
- Avaliar o desempenho do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) em DNA extraído de amostras biológicas de escarro de pacientes diagnosticados com tuberculose pulmonar;
- Comparar o desempenho do kit de LAMP em único tubo (KIT LAMPLIUTT-PCR) com o LAMP convencional, a qPCR e os testes convencionais de diagnóstico.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

As coletas de escarro são seguras, pode causar um pequeno desconforto durante e/ou após a expectoração (tosse). Todas as informações e explicações serão fornecidas pelo pesquisador e qualquer alteração deverá ser comunicada ao pessoal responsável que verificará a necessidade de cuidados adicionais.

Benefícios:

Contribuição para o desenvolvimento do projeto na parte biológica e ajuda na pesquisa do desenvolvimento de um novo kit molecular de diagnóstico para tuberculose pulmonar. Para realização, será realizada a coleta de 4mL de escarro, através de expectoração profunda (tosse forçada), utilizando um tubo pote descartável de plástico, estéril, de boca larga e tampa rosqueável. As coletas de escarro serão feitas pelo coordenador ou por uma das colaboradoras da pesquisa.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um trabalho de Mestrado, com grande relevância e importância para nossa população.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: cep.iam@fiocruz.br



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 5.238.453

Os autores realçam que "a possibilidade de um kit de diagnóstico rápido e eficaz certamente poderá contribuir no planejamento de ações específicas, conjuntas e articuladas, impactando na melhoria dos programas de controle da TB, em uma maior descoberta dos casos e auxílio aos métodos tradicionais para confirmação da doença."

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos entregues sem pendências.

**Recomendações:**

Entregas de relatórios parciais e final devem ser feitas via notificação. Os relatórios parciais devem ser apresentados, pelo menos, semestralmente. Qualquer alteração no protocolo no decorrer da pesquisa, como também mudança de equipe, devem ser informados via emenda. Todas as ações deve ser realizadas via Plataforma Brasil.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências relatadas no Parecer: 5.181.623 foram atendidas em sua totalidade.

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

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

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Vale ressaltar que, em relação ao protocolo de pesquisa, é previsto na Resolução 466/2012 no item XI - DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL, que o pesquisador deve apresentar ao CEP relatórios parciais e finais (subitem: d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final). Pede-se que o pesquisador entregue os relatórios como previsto no texto da resolução. Informamos que a entrega dos relatórios parciais precisam ser feitas a cada semestre, conforme cronograma de execução da pesquisa, via Plataforma Brasil.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO 1780319.pdf	10/01/2022 14:08:03		Aceito

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: cep.iam@fiocruz.br



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 5.238.453

Não

RECIFE, 11 de Fevereiro de 2022

---

Assinado por:  
Maria Almerice Lopes da Silva  
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420  
UF: PE Município: RECIFE  
Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: cep.iam@fiocruz.br