

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública

Livia Christina Alves da Silva

Avaliação da reprodutibilidade das reações e da estabilidade dos *kits* Nested-PCR em tubo único e Multiplex-PCR para aplicação no diagnóstico de peste

Recife
2010

LÍVIA CHRISTINA ALVES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DAS REAÇÕES E DA ESTABILIDADE DOS
KITS NESTED-PCR EM TUBO ÚNICO E MULTIPLEX-PCR PARA APLICAÇÃO NO
DIAGNÓSTICO DE PESTE**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Nilma Cintra Leal

Co-Orientadora: Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida

Recife

2010

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

S586a Silva, Livia Christina Alves da.

Avaliação da reprodutibilidade das reações e da estabilidade dos *kits* Nested-PCR em tubo único e Multiplex-PCR para aplicação no diagnóstico de peste / Livia Christina Alves da Silva. — Recife: L. C. A. Silva, 2010.

94 f.: il.

Dissertação (mestrado acadêmico em saúde pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

Orientadora: Nilma Cintra Leal, co-orientadora: Alzira Maria Paiva de Almeida

1. Peste-diagnóstico. 2. *Yersinia pestis*. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Avaliação. I. Leal, Nilma Cintra. II. Almeida, Alzira Maria Paiva de. III. Título.

CDU 616.98

LÍVIA CHRISTINA ALVES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DAS REAÇÕES E DA ESTABILIDADE DOS
KITS NESTED-PCR EM TUBO ÚNICO E MULTIPLEX-PCR PARA APLICAÇÃO NO
DIAGNÓSTICO DE PESTE**

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado em Saúde Pública do Centro de
Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de
Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Nilma Cintra Leal
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Microbiologia

Membro Externo / Titular: Dra. Marli Tenório Cordeiro
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Virologia

Membro Externo / Suplente: Dr. Fábio André Brayner dos Santos
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Parasitologia

Membro Interno / Titular: Dra. Cláudia Maria Fontes Oliveira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Entomologia

Membro Interno / Suplente (parecerista): Dr. Fábio Lopes de Melo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Parasitologia

Dedico esse trabalho as pessoas
mais importantes da minha vida,
meus pais Ivanalda e José
Caetano, minha irmã Laís e ao
meu noivo Artur.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Nilma Cintra Leal, por toda dedicação e principalmente pela confiança que demonstrou por mim. Terei sempre em mente o exemplo de pessoa e profissional que é.

A Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida, minha co-orientadora, pelas orientações indispensáveis para conclusão desse trabalho.

A minha amiga Silvana Vasconcelos pela dedicação e ajuda em todos os momentos que precisei.

A todos os amigos do laboratório e em especial a Bruna Caiado, Isaac Martins, Eduarda Mangueira, Larissa Melo, Ana Paula Rocha, Érika de Cássia que estiveram sempre dispostos a ajudar.

Aos meus pais Maria Iveralda Alves e José Caetano da Silva pelo amor e proteção que me enchem de forças para prosseguir.

Ao meu noivo Artur pelo companheirismo e afeto, que me passaram confiança e vontade de lutar por nossas vidas.

Obrigada a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse concretizado.

SILVA, Livia Christina Alves. **Avaliação da reprodutibilidade das reações e da estabilidade dos kits Nested-PCR em tubo único e Multiplex-PCR para aplicação no diagnóstico de peste.** 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

RESUMO

A peste, infecção pela *Yersinia pestis*, é considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma doença re-emergente, que pode causar impacto na saúde pública e a *Y. pestis* está classificada como agente classe A de bioterrorismo. O diagnóstico bacteriológico constitui o *gold standard* para o diagnóstico da peste, entretanto ele pode ser prejudicado por conservação e transporte inadequados das amostras, dos locais de coleta para os laboratórios de diagnóstico. Diante disso, estão sendo avaliados métodos moleculares de diagnóstico que possam ser utilizados no monitoramento das áreas focais e controle em condições emergenciais. O objetivo desse trabalho foi avaliar a reprodutibilidade das reações e a estabilidade de um *kit* Nested-PCR em tubo único (N-PCRTbU), em que os *primers* internos são fixados no interior da tampa do tubo de reação, tendo como alvo o gene *caf1* e de um outro *kit* baseado na técnica de Multiplex-PCR (M-PCR), que tem como alvo os genes *caf1*, *lcrV*, *pla* e *irp2*. Esses *kits* contêm todos os componentes da mistura de reação incluindo a enzima *Taq* polimerase. O DNA alvo e a água são adicionados no momento do uso. Para avaliar a melhor condição de estocagem foram preparadas duas séries de tubos: (1) para reações individuais e (2) *pool* para 10 reações. Os tubos foram estocados a -20°C e testados mensalmente. Para avaliar a reprodutibilidade, as reações foram realizadas em duplicata e o índice de Kappa de Cohen foi utilizado para análise estatística. Para avaliar a melhor condição de transporte foram simuladas duas condições: (1) congelamento em gelo seco e (2) liofilização dos reagentes após adição de trealose como estabilizador enzimático. Os *kits* foram testados por 12 meses, mantendo-se estáveis e em condições adequadas para uso. A liofilização se mostrou melhor que a refrigeração para o transporte. O N-PCRTbU oferece maior especificidade enquanto a M-PCR permite também a caracterização dos fatores de virulência da cepa isolada ou presente no material biológico. A disponibilidade de *kits* prontos para uso é de grande importância para descentralização do diagnóstico da doença, aumentando assim a eficiência das atividades de controle e vigilância no Brasil.

Palavras-chave: Peste-diagnóstico, *Yersinia pestis*, Reação em Cadeia da Polimerase.

SILVA, Livia Christina Alves. **Evaluation of the reproducibility of the reactions and the stability of kits single-tube nested PCR and multiplex-PCR for application in the plague diagnosis.** 2010. Dissertation (Master of Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

ABSTRACT

Plague, infection by *Yersinia pestis*, is considered by the World Health Organization as a reemerging disease; this infection is capable to cause impact in the Public Health and the bacteria *Y. pestis* is classified as a Class A bioterrorism agent. *Y. pestis* isolation is the “gold standard” for plague diagnosis. However, this can be impaired by inadequate storage and shipment of the samples from the collection sites to the diagnosis laboratories. Hence, molecular diagnosis methods are being developed and evaluated for using in the activities of surveillance of the focal areas and plague control in emergence situations. The objective of this work was to evaluate the stability of two diagnosis kits: single-tube nested PCR (STNPCR) and multiplex PCR (M-PCR) and the reproducibility of the reactions. In the STNPCR, targeting to the *caf1* gene, the inner primers are immobilized onto the inside of the microtubes caps. The MPCR is directed to multiple genes: *caf1*, *lcrV*, *pla* and *irp2*. Both kits contain all the components of the reaction mixture plus Taq polymerase enzyme. The targeted DNA and water are added at time of use. To evaluate the best storage condition, two series of tubes had been prepared: (1) individual reaction tubes and (2) 10 reaction pool tubes. The tubes were stored at -20°C and tested monthly. To assess the reproducibility, the reactions were performed in duplicate and the results were statistically analyzed by the Cohen's kappa coefficient. Two procedures had been employed to assess the best shipment condition, for the kits (1) freezing in dry ice and (2) lyophilization of the reagents added of trehalose as enzymatic stabilizer. The kits had been tested along 12 months proving stable and suitable for use. The lyophilization procedure proved better than refrigeration for shipment. The STNPCR offers higher specificity than the M-PCR test. However the multiplex procedure allows the characterization of the virulence factors of the infecting strain in the test sample. The availability of this kind of ready for use kits is highly important for the decentralization of plague diagnosis and will allow increasing the efficiency of the surveillance and control activities in Brazil.

Words-key: Plague-diagnosis, *Yersinia pestis*, Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição mundial da peste (OMS) 2000-2005.....	19
Figura 2	Focos de Peste no Brasil.....	20
Figura 3	<i>Yersinia pestis</i> visualizada por microscopia óptica em sangue humano...	21
Figura 4	Esquema representativo do genoma de uma cepa típica de <i>Y. pestis</i>	23
Figura 5	Indivíduos apresentando bubões pestosos.....	24
Figura 6	Possíveis caminhos de transmissão para o bacilo da peste, <i>Y. pestis</i>	25
Figura 7	Teste do bacteriófago para confirmação da <i>Y. pestis</i>	27
Figura 8	Esquema de preparo do <i>kit 1</i> N-PCRTbU.....	41
Figura 9	Esquema de preparo do <i>kit 2</i> N-PCRTbU.....	42
Figura 10	Esquema de preparo do <i>kit 1</i> M-PCR.....	43
Figura 11	Esquema de preparo do <i>kit 2</i> M-PCR.....	44
Figura 12	Esquema de realização dos testes para avaliação da reprodutibilidade das reações <i>kits 1 e 2</i> N-PCRTbU e M-PCR.....	45
Figura 13	Esquema de realização dos testes para avaliação da estabilidade dos <i>kits 1 e 2</i> N-PCR e M-PCR.....	47
Figura 14	Produto da amplificação do gene <i>caf1</i> nas reações com o <i>kit</i> N-PCRTbU nas formas 1 e 2 (<i>kit 1</i> e <i>kit 2</i>), para a avaliação da reprodutibilidade.....	52
Figura 15	Produtos da amplificação dos genes <i>pla</i> , <i>lcrV</i> , <i>caf1</i> e <i>irp2</i> nas reações do <i>kit</i> M-PCR, nas formas 1 e 2 (<i>kit 1</i> e <i>kit 2</i>), para a avaliação da reprodutibilidade.....	55
Figura 16	Produto da amplificação do gene <i>caf1</i> nas reações do <i>kit</i> N-PCRTbU nas formas 1 e 2 (<i>kit 1</i> e <i>kit 2</i>), para a avaliação da estabilidade.....	57
Figura 17	Produtos da amplificação dos genes <i>pla</i> , <i>lcrV</i> , <i>caf1</i> e <i>irp2</i> nas reações do <i>kit</i> M-PCR, condições 1 e 2 (<i>kit 1</i> e <i>kit 2</i>), para a avaliação da estabilidade.....	59
Figura 18	Produtos do N-PCRTbU e M-PCR com diferentes quantidades de DNA da cepa <i>Y. pestis</i> PE Exu 390-2.....	60
Figura 19	Produto das reações com <i>kits</i> N-PCRTbU e M-PCR armazenados em gelo seco por 4 dias.....	61
Figura 20	Produto da M-PCR com <i>kits</i> liofilizados após adição de trealose ao <i>mix</i> de reação.....	62

Figura 21 Produto do N-PCRTbU com *kits* liofilizados após adição de trealose ao *mix* de reação..... **63**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Cálculo do Índice de Kappa de Cohen.....	45
Tabela 2	Interpretação do Índice de Kappa de Cohen.....	46
Tabela 3	Comparação dos resultados dos observadores I e II para as reações com o <i>kit</i> 1 N-PCRTbU.....	51
Tabela 4	Comparação dos resultados dos observadores I e II para as reações com o <i>kit</i> 2 N-PCRTbU.....	51
Tabela 5	Comparação dos resultados dos observadores I e II para as reações com o <i>kit</i> 1 M-PCR.....	53
Tabela 6	Comparação dos resultados dos observadores I e II para as reações com o <i>kit</i> 2 M-PCR.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAB	Blood Agar Base
BHI	Brain Heart Infusion
CDC	Centers for Diseases Control and Prevention
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HA	Hemaglutinação
IAL	Instituto Adolfo Lutz
Kb	Kilobases
M-PCR	Multiplex-PCR
NB3	Nível de Biossegurança 3
N-PCR	Nested-PCR
N-PCRTbU	Nested-PCR em tubo único
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
pg	Picograma
pmol	Picomol
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
rpm	Rotações por minuto
RSI	Regulamento Sanitário Internacional
SRNP	Serviço Nacional de Referência em Peste
STE	SDC-Tris-EDTA
TBE	Tris, Borato, EDTA
TE	Tris: EDTA
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultra Violeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Definição de peste	17
2.2	Histórico da peste	17
2.3	Situação da peste no mundo	18
2.4	Situação da peste no Brasil	19
2.5	Etiologia	21
2.6	Aspectos genéticos e evolução da <i>Yersinia pestis</i>	22
2.7	Formas Clínicas	23
2.8	Modo de transmissão da peste	24
2.9	Diagnóstico laboratorial	26
2.9.1	<i>Diagnóstico bacteriológico</i>	26
2.9.1.1	<u>Exame direto</u>	26
2.9.1.2	<u>Cultura</u>	27
2.9.2	<i>Diagnóstico sorológico</i>	28
2.9.2.1	<i>Técnica de hemaglutinação</i>	28
2.9.3	<i>Diagnóstico Molecular</i>	28
2.9.3.1	<u>PCR</u>	29
2.9.3.2	<u>Multiplex-PCR (M-PCR)</u>	29
2.9.3.3	<u>Nested-PCR (N-PCR)</u>	30
2.9.3.4	<u>Nested-PCR em tubo único (N-PCRTbU)</u>	31
2.10	Tratamento da peste	32
2.11	Controle e prevenção da peste	32
3	JUSTIFICATIVA	34
4	PERGUNTA CONDUTORA	35
5	HIPÓTESE	36
6	OBJETIVOS	37
6.1	Geral	37
6.2	Específicos	37

7	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
7.1	Bactérias.....	38
7.2	Condições de cultivo.....	38
7.3	Extração do DNA total.....	39
7.4	Experimentos com Nested-PCRTbU.....	40
7.5	Experimentos com M-PCR.....	42
7.6	Eletroforese.....	44
7.7	Reprodutibilidade das reações.....	44
7.8	Estabilidade dos kits.....	46
7.9	Sensibilidade dos kits.....	47
7.10	Avaliação da estabilidade dos kits com base nas condições de transporte..	48
8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	49
9	RESULTADOS.....	50
9.1	Avaliação da reprodutibilidade das reações do kit N-PCRTbU.....	50
9.2	Avaliação da reprodutibilidade das reações do kit M-PCR.....	53
9.3	Avaliação da estabilidade do kit N-PCRTbU.....	56
9.4	Avaliação da estabilidade do kit M-PCR.....	58
9.5	Avaliação da sensibilidade dos kits.....	60
9.6	Avaliação da estabilidade dos kits com base nas condições de transporte...	61
9.6.1	<i>Transporte em gelo seco.....</i>	61
9.6.2	<i>Transporte em temperatura ambiente com reagentes liofilizados.....</i>	62
10	DISCUSSÃO.....	64
11	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69
	APÊNDICE A - Cálculo do Índice Kappa de Cohen: kit 1 M-PCR.....	77
	APÊNDICE B - Cálculo do Índice Kappa de Cohen: kit 2 M-PCR.....	78
	APÊNDICE C - Cálculo do Índice Kappa de Cohen: kit 1 N-PCRTbU.....	79
	APÊNDICE D - Cálculo do Índice Kappa de Cohen: kit 2 N-PCRTbU.....	80

1 INTRODUÇÃO

A peste é uma zoonose primordialmente dos roedores. O agente causador, a *Yersinia pestis*, geralmente é transmitido pelas pulgas, que podem ocasionalmente infectar outros mamíferos inclusive o homem (ALMEIDA *et al.*, 2005). É considerada uma doença re-emergente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (HIGGINS, 2004), constituindo um problema de Saúde Pública. Diante dos caracteres clínico-epidemiológicos da peste pneumônica, o Regulamento Sanitário Internacional (RSI) exige dos países a imediata notificação das ocorrências de peste humana, epizootias e registro de áreas infectadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007).

A peste chegou ao Brasil em 1899, durante a última pandemia, pelo porto de Santos no estado de São Paulo, fixando-se na zona rural (peste silvestre) entre os roedores silvestres, (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1965), constituindo áreas de focos que persistem até hoje. O foco do Nordeste localizado na região semi-árida do Polígono da Seca se estende do Estado do Ceará ao norte de Minas Gerais. Ainda existe outra zona pestosa no Estado de Minas Gerais fora do Polígono, no Vale do Rio Doce. O foco da Serra dos Órgãos abrange os municípios de Teresópolis, Sumidouro e Nova Friburgo, do Estado do Rio de Janeiro (BRASIL, 2005). Desequilíbrios ambientais podem alterar a distribuição dos roedores, ocasionando surtos da doença o que causaria sérias consequências médicas e socioeconômicas ao país. Tal fato torna a peste um problema merecedor de atenção (ALMEIDA *et al.*, 2005).

No Brasil, nenhum caso humano havia sido confirmado laboratorialmente desde 1997, mas em fevereiro de 2005, após oito anos, foi confirmado por exame sorológico, um caso de peste humana no Estado do Ceará (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Esses acontecimentos reforçam a importância de uma vigilância permanente nestes focos.

O diagnóstico bacteriológico tradicional utilizado na rotina de vigilância da peste pode ser prejudicado por conservação e transporte inadequados das amostras. Diante disso, o Serviço Nacional de Referência em Peste (SRNP) vem desenvolvendo e avaliando métodos de diagnóstico bacteriológicos e moleculares que possam ser utilizados na rotina e principalmente em situações emergenciais.

Várias técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) já foram utilizadas com sucesso para diagnóstico da peste diretamente em material biológico como: sangue, aspirado de bubão, vísceras de roedores e pulgas (LEAL; ALMEIDA, 1999; LEAL *et al.*, 1996; LOIEZ *et*

al., 2003). Esses métodos apresentam várias vantagens sobre as técnicas bacteriológicas convencionais: são eficientes mesmo quando a amostra não é viável para provas bacteriológicas tradicionais e os resultados são obtidos em poucas horas atendendo à necessidade de um diagnóstico rápido. O diagnóstico molecular consiste na identificação de genes de virulência presentes nos três plasmídeos e/ou no cromossomo da *Y. pestis* (CHU, 2000).

A Multiplex-PCR (M-PCR), em que são utilizados múltiplos pares de *primers* dirigidos a diferentes alvos numa mesma reação, foi padronizada por Leal e Almeida (1999) para diagnóstico de peste. Foi diagnosticado com essa técnica um caso suspeito de peste diretamente da hemocultura. Os *primers* são direcionados aos genes *caf1*, *pla* e *lcrV* localizados nos três plasmídeos de virulência e a um outro gene (*irp2*) presente na ilha de patogenicidade cromossomal da bactéria. Deste modo esta técnica além do diagnóstico permite também a identificação dos fatores de virulência das cepas.

A técnica Nested-PCR (N-PCR) é uma variação da PCR convencional que aumenta a sensibilidade e especificidade da PCR (ERLICH *et al.*, 1991). É um procedimento realizado em duas etapas de amplificação: na primeira é utilizado um par de *primers* que anelam em uma região mais externa ao alvo, posteriormente, os amplicons gerados na primeira reação servem como molde para a segunda etapa que utiliza *primers* dirigidos a uma região mais interna ao primeiro produto. Na transferência dos amplicons-molde para o microtubo da segunda reação, pode ocorrer contaminações cruzadas que podem alterar o resultado real (ERLICH *et al.*, 1991).

Abath *et al.* (2002) adaptaram as duas etapas do Nested-PCR num mesmo microtubo (N-PCRTbU) para diagnóstico de esquistossomose, diminuindo os riscos de contaminação das amostras por não ser necessário a abertura dos tubos entre as duas etapas de amplificação. Essa técnica foi padronizada para o diagnóstico da peste em amostras biológicas, tendo como alvo de amplificação o gene *caf1* codificador do antígeno F1 específico de *Y. pestis* e utilizado nos diagnósticos sorológicos (SOUZA *et al.*, 2007).

Em trabalho anterior (FARIAS, 2006, 2007) foram detectadas por PCR amostras positivas para peste, que eram multi-contaminadas e foram negativas por cultura, confirmando a ocorrência de peste registrada nos inquéritos sorológicos e comprovando a importância do emprego de técnicas moleculares. A proposta desse trabalho foi construir um *kit* N-PCRTbU e outro M-PCR, avaliando ao mesmo tempo a reprodutibilidade das reações e a estabilidade desses *kits* para uso na rede de diagnóstico de peste.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Definição de Peste

A peste, infecção pela *Yersinia pestis* é uma doença primária dos roedores silvestres. Normalmente o agente é transmitido de um animal a outro pela picada de pulgas infectadas. O homem pode ser infectado quando penetra no ecossistema de roedores durante atividades de caça, agricultura, comércio ou lazer. Em uma de suas formas clínicas, a pneumônica, a peste pode ser diretamente transmitida de homem à homem (ALMEIDA *et al.*, 2005).

2.2 Histórico da Peste

A peste tem uma longa história na humanidade, com sua provável origem no Planalto Central Asiático, ela se espalhou por quase todas as regiões do mundo e foi responsável por grande morbi-mortalidade em diferentes épocas. Acredita-se que os relatos mais antigos sobre peste datam da era pré-cristã e estão descritos na bíblia, mais precisamente no II Livro de Samuel (POLLITZER, 1954).

Achtman *et al.* (1999) admitem que a *Y. pestis* é um clone especializado derivado da *Yersinia pseudotuberculosis*, um patógeno entérico, que adquiriu a capacidade de infectar pulgas e usá-las como vetores de transmissão após a aquisição de fatores de virulência. Esses fatos teriam se passado provavelmente um pouco antes da primeira pandemia ocorrida na era cristã.

A primeira das três grandes pandemias de peste, conhecida como Peste de Justiniano, teve início em 542 d.C. no Egito e se disseminou por todo mundo civilizado, incluindo Ásia, África e Europa, tendo alta letalidade (PERRY; FETHERSTON, 1997; POLLITZER, 1954).

A segunda pandemia, a temível Peste Negra, ao contrário da primeira é bem descrita por muitos autores e documentos e sua repercussão na história se dá pelo fato de ter dizimado cerca de um quarto da população européia (PERRY; FETHERSTON, 1997). A Peste Negra teve início na Ásia, no século XIV e se espalhou por toda Europa e Norte da África, persistindo até o século XVI (POLLITZER, 1954). Muitas foram as evidências para explicá-la, mas a descoberta de

material genético de *Y. pestis* em cadáveres enterrados em covas medievais, forneceu suporte para considerar *Y. pestis* como o agente causador da Peste Negra (RAOULT *et al.*, 2000).

A terceira pandemia, a Pandemia Contemporânea, teve origem na Mongólia, se estendeu para Hong Kong em 1894, e de lá se espalhou por todo mundo através dos transportes marítimos (PERRY; FETHERSTON, 1997; POLLITZER, 1954). Apenas durante a Segunda Guerra Mundial, quando os antigos navios foram substituídos por outros a prova de ratos é que essa pandemia deixou de se expandir, mas foi a partir dela que se fixaram vários focos de peste por todos os continentes, exceto na Oceania (MOLLARET, 1989).

Acontecimentos importantes que marcaram a história da peste ocorreram em 1884, quando Alexander Yersin isolou pela primeira vez o bacilo da peste e em 1898 Paul-Louis Simond descobriu o papel da pulga na transmissão da doença (GAGE; KOSOY, 2005).

A peste foi introduzida no Brasil em 1899, pelo porto de Santos no Estado de São Paulo. A princípio assolou cidades litorâneas (peste portuária) e só a partir de 1906, através das estradas de ferro e outras vias atingiu as cidades interioranas (peste urbana), onde foi eliminada por medidas sanitárias, mas fixou-se nas zonas rurais (peste silvestre) entre os roedores silvestres, (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1965).

2.3 Situação da peste no mundo

No mundo, a peste é ainda considerada um problema de saúde pública, constituindo uma ameaça para muitos países da América do Norte, nos Estados Unidos; América do Sul, no Brasil, Equador, Peru e Bolívia; África, principalmente Congo, Madagascar, Moçambique, Uganda, e Tanzânia; e Ásia, na China, Vietnã, Mongólia e na Ásia Central (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006) (Figura 1).

Milhares de notificações de casos humanos de peste ocorrem anualmente à OMS, entretanto devido à vigilância inadequada e o temor do impacto que uma notificação teria sobre a economia de um país, o que temos são subestimativas da real situação (LEAL-BALBINO *et al.*, 2009). Um total de 11. 479 casos humanos de peste e 772 óbitos foram relatados por 14 países de 2004 a 2008. A tendência ascendente na incidência de casos humanos foi observada desde 2005, com uma incidência média global de 2083 casos anualmente. As manifestações recentes mostraram que a peste pode re-emergir nas áreas após um longo período de ausência (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

Após os atentados terroristas ocorridos em 11 de setembro de 2001, a peste e outras doenças ganharam um novo *status*, perdendo seu rótulo de doenças da pobreza. Essas doenças passaram a merecer a preocupação dos países desenvolvidos, em relação às medidas de controle contra possíveis ataques bioterroristas utilizando o bacilo da peste e outros microorganismos de rápida epidemização e grande letalidade (ALMEIDA *et al.*, 2005). A habilidade para causar infecção por meio de aerossóis e as complicações causadas pela peste pneumônica faz da *Y. pestis* uma potencial arma biológica (INGLESBY *et al.*, 2000).

Atualmente, estudiosos do *Wildlife Conservation Society* têm incluído a *Y. pestis* entre os doze patógenos que podem se disseminar para novas regiões como resultado de mudanças climáticas, com potencial impacto para saúde humana e economias globais (WILDLIFE CONSERVATION SOCIETY, 2008).

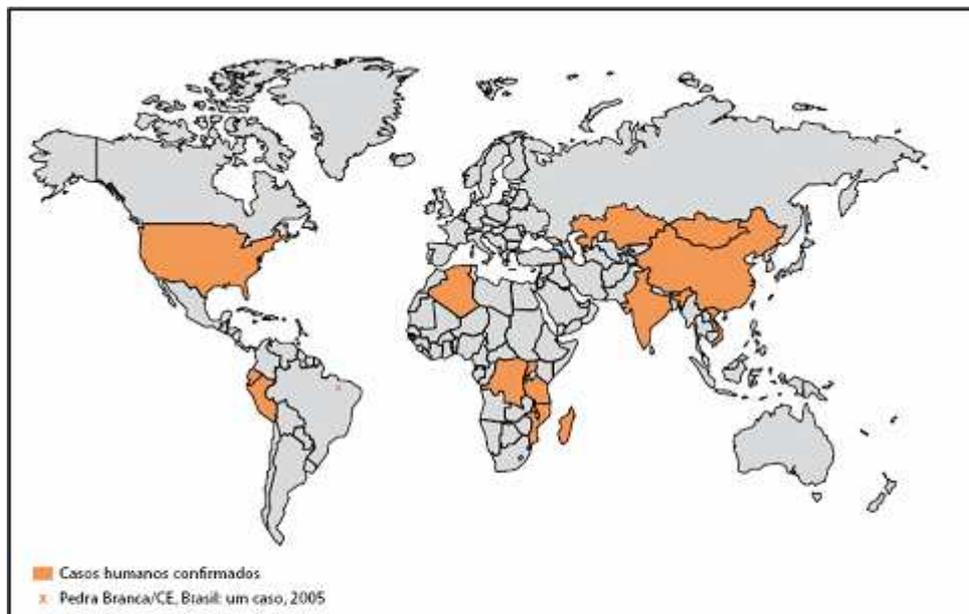


Figura 1: Distribuição mundial da peste (OMS) 2000-2005.
Fonte: Brasil (2008).

2.4 Situação da peste no Brasil

Após se estabelecer na zona rural, a peste persistiu em três focos naturais no Brasil. O foco do Nordeste localizado na região semi-árida do Polígono da Seca, que se estende do Estado do Ceará ao norte de Minas Gerais. As áreas pestíferas estão situadas em regiões serranas como a Serra da Ibiapaba e de Baturité (Ceará), Chapada do Araripe (Pernambuco, Ceará e Piauí),

Chapada da Borborema (Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas), na Serra de Triunfo (Paraíba e Pernambuco), Planalto Oriental (Bahia) e piemonte da Chapada Diamantina (Minas Gerais). Outra zona pestosa situada no Estado de Minas Gerais é a do Vale do Rio Doce. O foco da Serra dos Órgãos abrange os municípios de Teresópolis, Sumidouro e Nova Friburgo, do Estado do Rio de Janeiro (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2005) (Figura 2). A persistência desses focos deve ser considerada uma ameaça real e permanente de acometimento humano, podendo determinar seríssimas consequências médicas e socioeconômicas ao país, o que torna a peste um problema atual e merecedor de atenção (ALMEIDA *et al.*, 2005).



Figura 2: Focos de Peste no Brasil.
Fonte: Almeida *et al.* (2005).

No Brasil a incidência de casos de peste entrou em declínio nas áreas de foco a partir da década de 70, entretanto, a frequência de anticorpos específicos constatadas em inquéritos sorológicos realizados sistematicamente comprova a atividade da maioria deles (ALMEIDA *et al.*, 2005, 2007). Desde 1997 não havia sido confirmado laboratorialmente casos humanos, mas em fevereiro de 2005 houve o registro de um caso de peste humana no Estado do Ceará, no município de Pedra Branca, o que reforça a importância da vigilância permanente nestes focos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

2.5 Etiologia

O agente causador da peste, *Y. pestis*, é um bacilo gram-negativo, da família Enterobacteriaceae (Figura 3). Esse gênero possui outras 13 espécies, entre elas estão a *Yersinia pseudotuberculosis* e a *Yersinia enterocolitica*, dois patógenos entéricos, causadores de um quadro clínico denominado yersiniose e outras 11 espécies não patogênicas (MERHEJ *et al.*, 2008; PERRY; FETHERSTON, 1997; SPRAGUE *et al.*, 2008; SULAKVELIDZE, 2000).

A bactéria *Y. pestis* é visível ao microscópio óptico como um bacilo curto, com um padrão de coloração bipolar, quando corado com azul de metileno (Figura 3). É um microrganismo aeróbio ou anaeróbio facultativo, não-fermentador de lactose, não produz indol e nem hidrolisa a uréia. A temperatura ideal de crescimento é 28°C, em meios como Ágar sangue e MacConkey, requerendo 24 à 48 horas de observação. Suas colônias são translúcidas e menores que de outras enterobacteriáceas. A confirmação pode ser feita pela ação de um fago antipestoso específico, determinando uma área de lise. O crescimento em caldo peptonado é floculoso e sem turvação (PERRY; FETHERSTON, 1997).

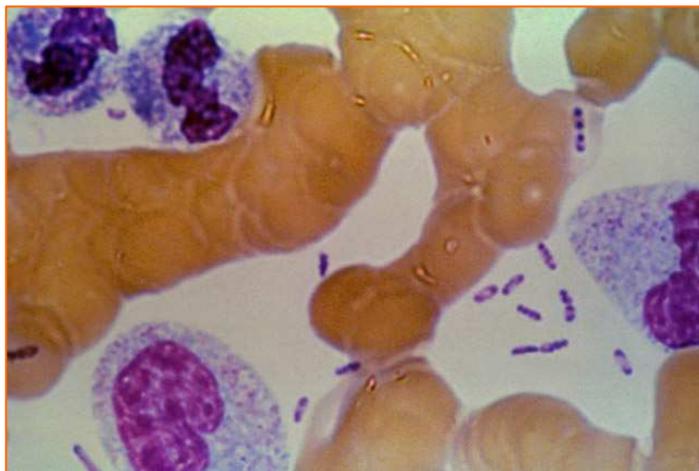


Figura 3: *Yersinia pestis* visualizada por microscopia óptica em sangue humano.
Fonte: Centers for Diseases Control and Prevention (2005).

Uma das principais características da *Y. pestis* é sua homogeneidade. Há apenas um sorotipo e um fagotipo e três biovars clássicos, chamados de variedades geográficas, que são definidas pela capacidade de reduzir o nitrato e fermentar o glicerol. Apesar de não diferirem quanto a patogenicidade, nem nas formas clínicas, cada um dos três biovars está associado a uma das três pandemias que ocorreram no passado: o biovar *Antiqua* ou *continental* (glicerol +; nitrato +), está associado à primeira pandemia; o biovar *Medievalis* (glicerol +; nitrato -),

associado à segunda pandemia e o biovar *Orientalis* ou *Oceânico* (glicerol – ; nitrato+), associado à terceira pandemia (PERRY; FETHERSTON, 1997). Um quarto biovar, denominado *Microtus* foi proposto para incluir as cepas chinesas avirulentas ao homem, que ao contrário dos três biovars clássicos, fermenta arabinose (ZHOU *et al.*, 2004).

2.6 Aspectos genéticos e evolucionários da *Yersinia pestis*.

O genoma da *Y. pestis* é constituído de um cromossomo, com aproximadamente 4.650 kb, onde existe uma região considerada uma “ilha de alta patogenicidade” (HPI). Possui três plasmídios prototípicos de fundamental importância para a virulência das cepas: pYV (\pm 70 kb), pFra (\pm 100 kb) e pPst (\pm 9,5 kb) (CARNIEL, 2001; DENG *et al.*, 2002; PARKHILL *et al.*, 2001; SONG *et al.*, 2004) (Figura 4).

Um caminho evolucionário foi proposto para *Y. pestis*. Durante toda a sua existência a *Yersinia spp* patogênica apresentou o plasmídio pYV, responsável por um complexo sistema de secreção tipo III e efetores que atuam nas células imune do hospedeiro, sendo essenciais para patogenicidade (BRUBAKER, 1991, 2004) e uma região de dependência ao cálcio (*lcrV*) para crescimento a 37°C (CORNELIS, 2000). Provavelmente o pYV foi um forte determinante na evolução da *Yersinia* como um patógeno entérico de mamíferos. Mais tarde, a *Yersinia pseudotuberculosis* adquiriu certo nível de habilidade para colonizar insetos, provavelmente através da obtenção do locus cromossomal *hms* que persistiu na *Y. pestis*. Esse locus atua na colonização da pulga pela bactéria, multiplicação da bactéria e consequente bloqueio do proventrículo da pulga, através da formação de um biofilme (HINNEBUSH *et al.*, 2002; ZUREK *et al.*, 2001).

O plasmídio pFra pode ter sido adquirido pelo contato com uma *Salmonella spp* no tubo digestivo de um inseto ou de um mamífero ou no sangue de um mamífero (PRENTICE *et al.*, 2001). Este plasmídio é fundamental à sobrevivência da *Y. pestis* no organismo do inseto ou do mamífero. O gene *cafI* localizado no plasmídio pFra, codifica um polipeptídeo capsular (antígeno F1), que é exportado para a superfície da célula, onde forma a cápsula fibrilar (ZAVIALOV *et al.*, 2003). Essa cápsula inibe a fagocitose por macrófagos em sinergismo com o sistema de secreção tipo III (DU *et al.*, 2002). Além disso, o pFra codifica também a fosfolipase D que auxilia a resistência da bactéria no tubo digestivo da pulga (HINNEBUSH *et al.*, 2002).

Em um evento subsequente, o plasmídio pPst, portador do gene *pla* que codifica o plasminogênio ativador foi adquirido, promovendo a disseminação da bactéria, formação de bubão em hospedeiros mamíferos e aumento da bacteremia na pulga infectada (SEBBANE *et al.*, 2006).

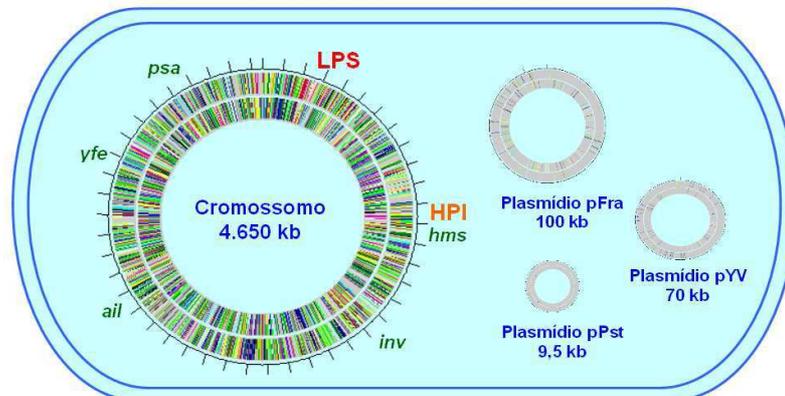


Figura 4: Esquema representativo do genoma de uma cepa típica de *Y. pestis*.
Fonte: Leal – Balbino *et al.* (2004).

2.7 Formas clínicas

A peste se apresenta usualmente sob três formas clínicas: bubônica, septicêmica e pneumônica. Existe ainda formas mais raras como a peste faringiana, a oftálmica e a meningial, ou mesmo uma forma oligossintomática denominada *pestis minor* (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A forma bubônica é a mais comum. Ela tem um período de incubação de dois a seis dias e inicia de forma abrupta com sintomas do tipo febre alta, calafrios, cefaléia intensa, mialgias, náuseas, vômitos, anorexia, prostração, mal-estar em geral, confusão mental e taquicardia. O sintoma mais característico é o bubão, que costuma aparecer no segundo ou terceiro dia após o início da infecção. O bubão é ovalado, apresenta a pele distendida, brilhante, com coloração vermelho escuro, as vezes hemorrágico, raramente ulcerado, mas extremamente doloroso (BRASIL, 2008). Ele é resultado da inflamação aguda dos linfonodos que drenam a área de inoculação do bacilo (ALMEIDA *et al.*, 2005) (Figura 5).

A peste septicêmica primária é pouco freqüente, ela é caracterizada pela presença de bacilo no sangue e não apresenta comprometimento evidente dos linfonodos. Clinicamente a peste septicêmica assemelha-se a septicemias causadas por outros gram-negativos (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). O estado geral é grave, com prostração intensa, pulso rápido,

dispnéia, hemorragia cutânea, mucosa e até nos órgãos internos, sobrevém rapidamente o coma e o paciente vai a óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A forma mais grave da doença é a peste pneumônica, devido ao seu potencial de epidemização e alta letalidade (ALMEIDA *et al.*, 2005). Ela pode ser secundária à forma bubônica ou à septicêmica, ou primária quando há contato direto com tecidos de animais infectados, com doente de peste pulmonar ou ainda pela disseminação de aerossóis contaminados pelo bacilo da peste em guerra bacteriológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Tem início súbito e rápida evolução, com febre acima de 40°C, calafrios, astenia, náusea, vômitos, hipotensão arterial, arritmias. Na falta de tratamento adequado, a toxemia se torna significativa, levando à delírios, coma e por fim à morte (ALMEIDA *et al.*, 2005).



Figura 5: Indivíduos apresentando bubões pestosos.
Fonte: Brasil (2008).

2.8 Modo de transmissão da peste

A peste é uma doença primária dos roedores. A principal forma de transmissão do bacilo da peste é através da picada da pulga infectada que se contamina ao ingerir sangue infectado de hospedeiros (PERRY; FETHERSTON, 1997). Os roedores são os principais reservatórios da peste. Embora nem todas as espécies tenham a mesma importância, cerca de 230 espécies de roedores albergam naturalmente a *Y. pestis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A pulga pode infectar outros animais inclusive o homem (PERRY; FETHERSTON, 1997). Os casos humanos geralmente são precedidos por epizootias, mortandade de roedores, sem causa aparente. Com a morte do roedor, as pulgas são forçadas a buscar hospedeiros alternativos (STENSETH *et al.*, 2008).

Alguns animais lagomorfos, marsupiais, insetívoros, carnívoros selvagens e domésticos, também pode contrair a infecção. As aves são refratárias à infecção, mas podem carrear pulgas ou carcaças infectadas para outras localidades (STENSETH *et al.*, 2008). Animais domésticos podem carrear pulgas infectadas de roedores silvestres para dentro das casas e transmitir a doença aos seus donos através de mordidas, arranhaduras e principalmente através de aerossóis, caso tenham desenvolvido a forma pulmonar (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Um cuidado especial deve ser tido por profissionais como veterinários e laboratoristas para não se contaminarem com tecidos de animais infectados por meio do contato com abrasões na pele, conteúdo do bubão, conjuntiva ocular ou mucosa orofaríngea (LEAL-BALBINO *et al.*, 2009).

A forma pneumônica primária pode ser transmitida de pessoa a pessoa por meio de aerossóis e também através da disseminação da *Y. pestis* durante ataques bioterroristas (INGLESBY *et al.*, 2000; STENSETH *et al.*, 2008).

O homem e roedores infectados contribuem para a dispersão da doença quando se deslocam para locais distantes (LEAL-BALBINO *et al.*, 2009). Em 2002 foram confirmados dois casos alóctones de peste bubônica em Nova York, em indivíduos procedentes do Novo México, área focal (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004). Então mesmo os países não endêmicos devem avaliar a possibilidade de surgimento de novos focos naturais.

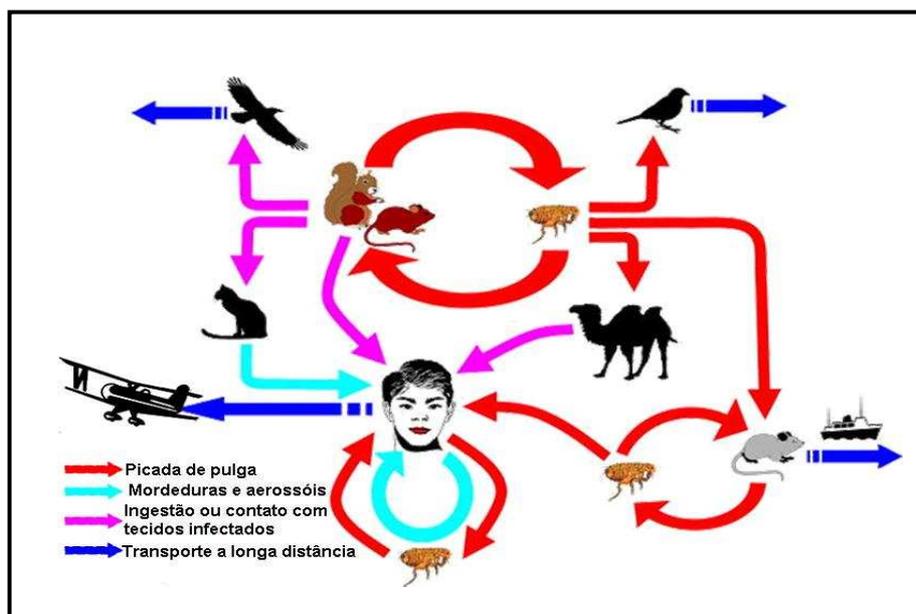


Figura 6: Possíveis caminhos de transmissão para o bacilo da peste, *Y. pestis*,
Fonte: Stenseth *et al.* (2008).

2.9 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da peste é feito através de técnicas bacteriológicas, sorológicas e as moleculares também já são aceitas pela OMS. O *gold standard* para o diagnóstico de *Y. pestis* é o isolamento da bactéria por meio de cultura (CHU, 2000), entretanto esse procedimento além de demorado pode ser prejudicado por transporte e conservação inadequados das amostras.

A *Y. pestis* é considerada um patógeno de classe 3, o que requer instalações especiais para o seu manuseio, além disso, os profissionais envolvidos nessas atividades devem estar conscientes do risco existente (ALMEIDA *et al.*, 2005).

2.9.1 Diagnóstico bacteriológico

Consiste no isolamento da bactéria, a partir do sangue, aspirado de bubão, líquido cefalorraquidiano, secreção brônquica do homem, macerado de pulgas ou ainda sangue e vísceras de roedores (CHU, 2000).

2.9.1.1 Exame direto

No exame direto é preparado um esfregaço do material que pode ser de origem humana ou animal e após secagem na lâmina, utiliza-se um desses três métodos para coloração: método de Gram, corante de Wayson ou coloração por azul de metileno. O método de Gram permite observar os bacilos pestosos nos esfregaços, contudo o corante de Wayson e o azul de metileno são mais simples e ressaltam o aspecto bipolar da bactéria, facilitando a identificação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

2.9.1.2 Cultura

As diversas amostras de material humano, de animais ou de pulgas são semeadas em duas placas de gelose peptonada (Blood Agar Base = BAB), em pH na faixa de 7,4 a 7,6 e a temperatura ideal para o crescimento é 28°C (KARIMI, 1978; CHU, 2000). Depois do semeio instila-se uma gota do bacteriófago antipestoso específico em uma das placas. A lise provocada pelo fago pode ser percebida dentro de 18 a 24 horas (Figura 7), mas as colônias de *Y. pestis* só tomam seu aspecto característico após 48/72 horas de incubação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).



Figura 7: Teste do bacteriófago para confirmação da *Y. pestis*.
Fonte: Brasil (2008).

O cultivo em caldo Brain Heart Infusion (BHI) é realizado sob as mesmas condições de temperatura e pH utilizados para cultura em placa. O crescimento pode ser visualizado após 24/48 horas, o aspecto é flocular e não há turvação (CHU, 2000).

Apesar da cultura ser considerada padrão ouro no diagnóstico da peste, procedimentos inadequados de transporte e conservação podem causar dessecação ou contaminação das amostras ou morte da bactéria (LEAL; ALMEIDA, 1999).

2.9.2 Diagnóstico sorológico

Quando as amostras não são viáveis para cultura, a utilização de exames sorológicos torna-se essencial (ALMEIDA *et al.*, 2005). O diagnóstico sorológico é baseado na pesquisa de anticorpos contra a proteína capsular da *Y. pestis* (fração antigênica 1 ou F1).

2.9.2.1 Técnica de hemaglutinação

Entre as técnicas sorológicas a de hemaglutinação com hemácias de carneiro (HA) é a mais recomendada para o diagnóstico de casos humanos, rastreamento da peste em roedores e em inquéritos sorológicos para delimitação dos focos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Apesar de ser usada em larga escala no diagnóstico da peste, a hemaglutinação apresenta vários inconvenientes: complexidade, reagentes perecíveis e baixa sensibilidade (ALMEIDA *et al.*, 2005).

2.9.3 Diagnóstico molecular

Os métodos moleculares foram propostos como um rápido caminho para identificar sequências de DNA de organismos patogênicos em doenças infecciosas, com diagnóstico potencial mesmo quando a bactéria não é mais viável (ERLICH *et al.*, 1991). Resultados rápidos permitem o acionamento imediato das medidas de controle, que é de grande importância para doenças de rápida epidemização, como a peste. Genes de virulência plasmidiais e cromossomais da *Y. pestis* são utilizados como alvo para identificação e caracterização das cepas em humanos, roedores e pulgas (CHU, 2000).

2.9.3.1 PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) desenvolvida por Mullis e Faloona (1987) tem destaque entre os métodos moleculares. Nessa técnica, diminutas quantidades de seqüências de DNA ou RNA são enzimaticamente amplificadas até que alcancem uma concentração suficiente para ser detectada. A PCR tem por base que cada agente causador de uma doença possui seqüência característica própria em sua composição de DNA ou RNA, pela qual pode ser identificado (KONEMAN, 2001).

A PCR consiste de três etapas fundamentais que juntas correspondem a um ciclo da reação: desnaturação da fita dupla do DNA, anelamento do par de *primers* e extensão destes com auxílio da enzima *Taq* DNA polimerase. Cada etapa é realizada a uma temperatura diferente e os ciclos ocorrem repetidas vezes. No final do processo a quantidade desejada do DNA-alvo é alcançada, tornando possível sua detecção (KONEMAN, 2001).

Além da investigação em amostras recentes a PCR também pode ser utilizada na análise de amostras antigas. Através da PCR foi identificado material genético de *Y. pestis* em tecido coletado da polpa dentária de esqueletos de vítimas da “Peste Negra” (séc. XIV-XVI). Os resultados desse estudo acabaram com as dúvidas de que *Y. pestis* teria ou não sido o agente causador dessa pandemia (RAOULT *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, vários protocolos baseados em PCR foram desenvolvidos para o diagnóstico da peste em material humano ou animal como: sangue, aspirado de bubão, vísceras de roedores e macerado de pulgas (LEAL; ALMEIDA, 1999; LEAL *et al.*, 1996, LOIEZ *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2007), todos eles baseados na utilização de genes de virulência plasmidiais e cromossomais da *Y. pestis* como alvo para identificação e caracterização dessa bactéria.

2.9.3.2 Multiplex-PCR (M-PCR)

É uma variação da PCR convencional na qual são utilizados múltiplos pares de *primers* dirigidos a diferentes alvos, numa mesma reação. Assim é possível amplificar de modo simultâneo seqüências-alvo de diferentes microrganismos ou mais de uma seqüência-alvo de um mesmo microrganismo (KONEMAN, 2001).

A M-PCR foi padronizada para o diagnóstico de peste e seus *primers* são direcionados aos genes: *irp2*, presente na ilha de patogenicidade cromossomal; *caf1*, *lcrV* e *pla*, presentes respectivamente nos plasmídeos pFra, pYV e pPst (LEAL; ALMEIDA, 1999).

Nos diversos focos de peste, inclusive no Nordeste do Brasil, foram encontradas cepas atípicas faltando algum plasmídeo ou contendo plasmídeos adicionais (FILIPPOV *et al.*, 1990; LEAL *et al.*, 1997, 2000). A M-PCR se torna então importante, principalmente para estudos epidemiológicos, pois além do diagnóstico ela permite também a caracterização dos fatores de virulência clássicos das cepas de *Y. pestis*. Esta técnica foi empregada com sucesso no diagnóstico de peste diretamente em hemocultura humana, sem prévio isolamento da bactéria ou extração de DNA e mostrou-se útil também para estudos retrospectivos (LEAL; ALMEIDA, 1999; MELO *et al.*, 2003).

2.9.3.3 Nested-PCR (N-PCR)

A técnica Nested-PCR (N-PCR) é uma variação da PCR quando se deseja melhorar a sensibilidade e especificidade (ERLICH *et al.*, 1991). É um procedimento realizado em duas etapas de amplificação: na primeira é utilizado um par de *primers* que anelam em uma região mais externa ao alvo, posteriormente, os amplicons gerados na primeira reação servem como molde para a segunda etapa que utiliza *primers* dirigidos a uma região mais interna ao primeiro produto. A reamplificação do produto aumenta a sensibilidade da técnica, no entanto, a transferência dos amplicons-molde para o microtubo da segunda reação aumenta o risco de ocorrer contaminações cruzadas que podem alterar o resultado real (ERLICH *et al.*, 1991).

A N-PCR foi adaptada para uso em baço de roedores sem extração prévia de DNA, tendo como alvo de amplificação o gene *caf1* codificador do antígeno F1 específico de *Y. pestis* (LEAL *et al.*, 1996). Em trabalho posterior foi analisado o limiar de detecção da PCR convencional com os *primers* internos e com os *primers* externos e da N-PCR, usando como molde DNA extraído de *Y. pestis* e suspensões bacterianas. Foi demonstrado que para PCR convencional a amplificação é visível até quando a amostra tem 100pg de DNA e em outra situação quando a suspensão tem até 2000 unidades formadoras de colônia (UFC). Já para N-PCR a amplificação é visível até 1pg de DNA e 2 UFC (SOUZA *et al.*, 2007), mostrando então o quanto a N-PCR é mais sensível que uma PCR simples.

2.9.3.4 Nested-PCR em tubo único (N-PCRTbU)

Para reduzir o risco de contaminação, as duas etapas da técnica de Nested-PCR foram adaptadas para um mesmo microtubo, Nested-PCR em tubo único. Deste modo os dois pares de *primers* são adicionados no mesmo tubo de reação (ERLICH *et al.*, 1991). Para evitar a competição entre os pares de *primers* permitindo que eles atuem em momentos distintos, são propostas duas alternativas: uma delas é usar diferentes temperaturas de anelamento para cada par de *primers* (GOOKIN *et al.*, 2002; HERRMANN *et al.*, 1996; LLOP *et al.*, 2000; MATHIS *et al.*, 1996; YLITALO *et al.*, 1995) e a outra é promover a separação física dos mesmos (ABATH *et al.*, 2002; BERG *et al.*, 2001; OLMOS *et al.*, 1999).

Abath *et al.* (2002) desenvolveram para o diagnóstico da esquistossomose uma N-PCRTbU, com os pares de *primers* internos e externos separados fisicamente, na forma seguinte: os *primers* internos são fixados por evaporação na tampa do microtubo e os *primers* externos são adicionados no fundo do tubo junto com os demais reagentes de PCR. Assim, na primeira etapa da reação quem atua são os *primers* externos. Ao final dessa etapa o tubo é invertido várias vezes a fim de que os *primers* fixados na tampa sejam diluídos, deste modo, na segunda etapa da reação quem atua são os *primers* mais internos ao alvo. Essa técnica foi padronizada para o diagnóstico da peste em amostras biológicas, com os dois pares de *primers* direcionados ao gene *cafI* da *Y. pestis* (SOUZA *et al.*, 2007).

O limiar de detecção da N-PCRTbU utilizando DNA extraído de *Y. pestis* e suspensão bacteriana foi analisado e os resultados demonstraram uma sensibilidade um pouco menor que para a N-PCR convencional. Para a N-PCRTbU a amplificação foi visível até 10pg de DNA e 20 UFC em suspensão (SOUZA *et al.*, 2007), sendo então seu limiar de detecção 10 vezes menor que para N-PCR convencional. Essa redução na sensibilidade pode ser explicada devido a presença de potenciais inibidores da *Taq* DNA polimerase presentes na reação de N-PCRTbU e que na reação de N-PCR convencional são diluídos no segundo tubo de reação que contém um novo *mix* de reagentes (MENDES, 2007). Entretanto, essa redução na sensibilidade é compensada pela redução do risco de contaminação durante a transferência de amostra de um tubo a outro.

2.10 Tratamento da peste

Os antibióticos de escolha para o tratamento da peste são os aminoglicosídeos, estreptomicina e gentamicina. A estreptomicina é considerada como padrão ouro para casos de peste pneumônica e a gentamicina é prescrita para quaisquer formas da doença (LEAL-BALBINO *et al.*, 2009).

Nos últimos tempos, as quinolonas têm ganho um papel importante na terapêutica dessa doença (LEAL-BALBINO *et al.*, 2009). Entretanto cumpre ressaltar que na década de 1990, foram detectadas cepas de *Y. pestis* multirresistentes em Madagascar e cepas resistentes às quinolonas na Rússia (ALMEIDA *et al.*, 2005).

As tetraciclinas e o clorafenicol são antimicrobianos de segunda escolha. A tetraciclina para casos não complicados e o clorafenicol para todas as formas clínicas. Já os betalactâmicos não devem ser utilizados, pois são ineficazes para o tratamento da peste e podem elevar o risco de complicações (LEAL-BALBINO *et al.*, 2009).

O tratamento deve ser iniciado o mais precocemente possível a fim de evitar a evolução da doença, dada sua rapidez e gravidade (ALMEIDA *et al.*, 2005). O Centro de Controle de Doenças (CDC) recomenda que o paciente permaneça isolado durante as primeiras 48 horas após o início do tratamento devido ao risco de evolução para pneumonia, forma altamente contagiosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

2.11 Controle e prevenção da peste

As atividades de controle devem ser desenvolvidas em todas as áreas pestíferas e por exigência do Regulamento Sanitário Internacional nos portos e aeroportos internacionais. Elas têm por objetivo evitar a infecção de humanos pelo controle dos focos naturais; reduzir a letalidade e impedir a ocorrência de epidemias; avaliar continuamente o risco de infecção para humanos e impedir a reintrodução da peste urbana através de portos e aeroportos (BRASIL, 2008).

As principais recomendações para controle da peste são: vigilância contínua das áreas de foco, identificação e tratamento precoce de casos humanos, quimioprofilaxia (tetraciclinas ou

fluoquinolonas), e a notificação e intercâmbio com as organizações internacionais de saúde (LEAL-BALBINO *et al.*, 2009). Também é recomendado trabalho laboratorial em nível 3 de biossegurança; transporte e guarda de amostras biológicas e cepas isoladas em condições rigorosas de biossegurança, em função do risco potencial de uso da *Y. pestis* como agente de bioterrorismo (ALMEIDA *et al.*, 2005; STENSETH *et al.*, 2008).

Ainda não há uma vacina disponível comercialmente, apesar de novos produtos estarem sendo avaliados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Uma vacina com microrganismos atenuados é recomendada apenas para profissionais em situação de risco, entretanto essa vacina não protege contra a peste pneumônica primária e é pouco eficaz contra a peste bubônica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1999).

É necessário que a população em geral tome conhecimento da gravidade da peste, do seu ciclo epidemiológico e que seja orientada como evitar a exposição a situações de risco (LEAL-BALBINO, *et al.*, 2009). Quanto aos profissionais de saúde é essencial que estejam preparados para lidar com o problema, porque infelizmente para a maioria deles o desconhecimento é regra (ALMEIDA *et al.*, 2005).

3 JUSTIFICATIVA

No mundo, a peste é ainda considerada um problema de saúde pública, constituindo ameaça para alguns países da América do Norte, América do Sul, África e Ásia. Novos casos humanos de peste devem ser prontamente diagnosticados e os focos ambientais mantidos sob vigilância constante.

No Brasil, há focos ativos de peste que são monitorados pelo Ministério da Saúde em colaboração com as Secretarias de Saúde dos municípios onde estão localizados os focos.

Métodos de diagnóstico rápidos, específicos e reprodutivos são necessários para essas atividades. Assim testes que possam ser utilizados pelos laboratórios regionais responsáveis pelo diagnóstico são importantes.

O desenvolvimento de *kits* de diagnóstico baseados nas técnicas de N-PCRTbU e M-PCR, já aplicadas na detecção de *Y. pestis* em diferentes tipos de materiais biológicos, terá fundamental importância. Evitará erros de pipetagem e contaminação cruzada durante o preparo da mistura de reação e reduzirá o tempo de diagnóstico.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Em que medida as reações com os *kits* Nested-PCR em tubo único e Multiplex-PCR são reprodutíveis e por quanto tempo esses *kits* serão estáveis estando armazenados à -20° C, durante um período de 12 meses?

5 HIPÓTESE

Os *kits* baseados nas técnicas de Nested-PCR em tubo único e Multiplex-PCR apresentam reações reprodutíveis e podem ser armazenados à -20° C, permanecendo estáveis por pelo menos 12 meses.

6 OBJETIVOS

6.1 Geral

Avaliar a reprodutibilidade das reações e a estabilidade dos *kits* Nested-PCR em tubo único e Multiplex-PCR para aplicação no diagnóstico de peste.

6.2 Específicos

- a) Formular *kits* contendo reagentes para as técnicas de N-PCRTbU e M-PCR;
- b) Avaliar a reprodutibilidade das reações por repetição dos experimentos;
- c) Avaliar a estabilidade dos *kits* à -20°C, durante 12 meses;
- d) Avaliar a estabilidade dos *kits* com base nas condições de transporte

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Bactérias

O DNA da cepa *Y. pestis* P. Exu 390-2 da coleção de *Yersinia spp.* do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz (CPqAM-Fiocruz) foi utilizado como controle positivo para todas as reações de PCR. Essa cepa contém todos os fatores de virulência presentes nos três plasmídios e no cromossomo da bactéria.

O DNA de um clone mutante da cepa *Y. pestis* P. PB 881 isolada em 1986 da hemocultura de um paciente do Estado da Paraíba (ALMEIDA *et al.*, 1989) foi utilizado como controle negativo para reações de N-PCRTbU. Apesar dessa cepa ter apresentado em outros trabalhos (LEAL; ALMEIDA, 1999; SOUZA *et al.*, 2007) os fatores de virulência clássicos da espécie, em testes subsequentes ela mostrou ter perdido um de seus plasmídios, o pFra. Com isso, a cepa *Y. pestis* P. PB 881 não apresenta o gene *caf1* que é alvo da amplificação na reação de N-PCRTbU, podendo então servir como controle negativo para a mesma.

Como controle negativo para as reações de M-PCR, foi utilizado o DNA de um clone mutante da cepa *Y. enterocolitica* 41. Essa cepa foi isolada de suíno sadio no estado do Rio de Janeiro e a princípio apresentava o plasmídio pYV e o gene *irp2* (LEAL *et al.*, 1997), entretanto novos testes mostraram que ela não possui mais nenhum dos genes de virulência característicos das yersinias patogênicas.

Todas essas cepas fazem parte da coleção de *Yersinia spp.* do CPqAM-Fiocruz e estão estocadas na bacterioteca do Serviço Nacional de Referência em Peste (SNRP), no Laboratório de nível de biossegurança 3 (NB3), estando conservadas em camada alta de gelose, em câmara fria (4°C).

7.2 Condições de cultivo

As cepas de *Y. pestis* estocadas foram reativadas por semeio em caldo “Brain Heart Infusion” (BHI-Difco) e incubadas a 28°C por 48 horas. Em seguida, uma alíquota do caldo foi semeada em placas de Blood Agar Base (BAB-Imedia). Para confirmação da pureza 2 ou 3

colônias com morfologia característica de *Y. pestis* foram repicadas individualmente em caldo BHI e plaqueadas em meio BAB, no semeio foi adicionado gotas do fago antipestoso. Após 24 horas de incubação a 28°C observou-se a lise provocada pelo fago no local onde foi instilado (KARIMI *et al.*, 1978)

A cepa *Y. enterocolitica* 41 foi semeada em BHI, incubada a 37°C por 24 horas e em seguida plaqueada em meio BAB. Colônias com aspecto característico de *Y. enterocolitica* foram confirmadas através de nove testes bioquímicos reunidos no meio de Rugai e Araújo modificado por Pessoa e Silva. Esse meio é utilizado para identificação de membros da família *Enterobacteriaceae*, permitindo em um só tubo verificar fermentação da sacarose e glicose, produção de gás, H₂S e indol, hidrólise da uréia, desaminação do L-triptofano, descarboxilação da L-lisina e motilidade (PESSOA; SILVA, 1972; RUGAI; ARAUJO, 1968).

O crescimento das cepas de *Y. pestis* e *Y. enterocolitica* em BHI foi utilizado para extração do DNA total.

7.3 Extração do DNA total

A extração do DNA genômico das cepas de *Y. pestis* e *Y. enterocolitica* foi baseada no protocolo de extração de Souza *et al.* (2007). Os procedimentos para extração do DNA de *Y. pestis* foram realizados em laboratório NB3, com todos os equipamentos de segurança necessários.

Um mililitro de cada cultura em BHI foi utilizado para essa extração. Esse volume foi centrifugado a 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado, o sedimento suspenso em 500µl de TE e homogeneizado. Em seguida foram adicionados 10µl de lisozima (10mg/ml) e após homogeneizar adicionou-se 10µl de proteinase K (5mg/ml). A suspensão foi incubada a 60°C por 20 minutos seguido da adição de 100µl de STE (SDS 2,5%, Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 0,25M), 15 minutos de incubação a 60°C, 5 minutos a temperatura ambiente e 5 minutos em banho de gelo. A suspensão foi neutralizada com 130µl de acetato de amônio 7,5M, mantida em banho de gelo por mais 15 minutos e depois centrifugada por 5 minutos a 12.000 rpm. Aproximadamente 700µl de sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionando o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA precipitado com aproximadamente 420µl de isopropanol e armazenado a -80°C por 30 minutos ou a -20°C por 24 horas seguido de

centrifugação por 10 minutos e descarte do sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em 10µl de RNase (10mg/ml) e conservado a -20°C.

A qualidade do DNA obtido foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 10µl do corante *Sybr Safe* (Invitrogen, Brasil). Foi utilizado tampão TBE (Tris-borato 0,089 M; ácido bórico 0,089M; EDTA 0,002M), a 100V. Após a eletroforese o DNA foi observado sob luz UV. A quantificação foi realizada por comparação com uma quantidade conhecida de DNA do fago *lambda* clivado pela enzima *HindIII* usando o programa 1D Image Analysis, versão 3.5 (Kodak Digital Science).

7.4 Experimentos com Nested-PCRTbU

Para as reações de N-PCRTbU, foi utilizado um par de *primers* direcionado a uma região mais externa da sequência do gene *cafI*, alvo da reação e um par de *primers* direcionado a uma região mais interna desse alvo, o fragmento esperado após essa amplificação apresenta aproximadamente 500 pares de bases (pb). Os *primers* apresentam os seguintes desenhos:

- a) *Primers* externos: 5'-CAG TTC CGT TAT CGC CAT TGC 3' e 5' TAT TGG TTA GAT ACG GTT ACG GT-3' (NORKINA *et al.*, 1994).

- b) *Primers* internos: 5'-TTG GAA CTA TTG CAA CTG CTA 3' e 5' TTA GAT ACG GTT ACG GTT A-3' (LEAL *et al.*, 1996).

Seguindo o protocolo descrito por Souza *et al.* (2007) os microtubos foram previamente preparados para as reações de N-PCRTbU. Um microlitro de cada *primer* interno (20 pmol) foi aplicado na face interna da tampa de cada microtubo juntamente com traços do corante azul de bromofenol (adicionado para facilitar a visualização após a diluição). Os tubos foram mantidos abertos em cabine de segurança biológica por aproximadamente 40 minutos para fixação dos *primers* por evaporação. Para o *mix* de reação foi utilizado: Tampão (Tris-HCl 20mM-pH 8,0; KCl 100mM) ; MgCl₂ 3,0mM; dNTP's (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) 0,4mM; 2 pmol de cada *primer* externo e 2U de *Taq* DNA polimerase. Foi utilizado 20ng do DNA purificado das cepas *Y. pestis* P. Exu 390-2 e *Y. pestis* P. PB 881, como controle positivo e negativo respectivamente. Para todas as reações foi utilizado o *kit Taq Polymerase Recombinant* da Invitrogen. Todas as

reações tiveram um volume total de 50 μ l, em microtubos com os *primers* internos pré-fixados, contendo 14,5 μ l da mistura de reação, 1 μ l de DNA (20ng) e 34,5 μ l de água mili Q.

As amplificações foram realizadas em termociclador Biometra trio thermoblock e em termociclador Mastercycler eppendorf. O primeiro equipamento não possui a tampa que impede a evaporação do *mix* de PCR durante os ciclos, sendo necessário adicionar sobre a mistura de reação uma camada de óleo mineral estéril. Para o segundo equipamento que possui esse tipo de tampa, foi necessário padronizar a temperatura da mesma, a fim de evitar a condensação dos *primers* fixados na face interna da tampa do microtubo de reação. A temperatura ideal encontrada foi 99°C. Para os dois casos as temperaturas e a duração dos ciclos foi sempre a mesma. A primeira etapa do N-PCRTbU consiste de 15 ciclos compostos de 1 minuto a 90°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C e uma etapa de extensão de 7 minutos a 72°C. Após a primeira fase de amplificação os tubos são aquecidos a 90°C por aproximadamente dois minutos e em seguida invertidos várias vezes para diluição dos *primers* fixado na tampa do microtubo. Os tubos são brevemente centrifugados e submetidos à segunda fase de amplificação composta por 45 ciclos de 1 minuto a 90°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C seguidos de uma etapa final de 7 minutos a 72°C.

Para avaliar a melhor condição de estocagem o *kit* foi preparado sob duas formas:

- a) *Kit* 1 N-PCRTbU – Microtubos individuais com todos os reagentes prontos para reação (Tampão, dNTP, MgCl₂; *primers* internos e externos, *Taq* polimerase), exceto o DNA e a água Figura 8).

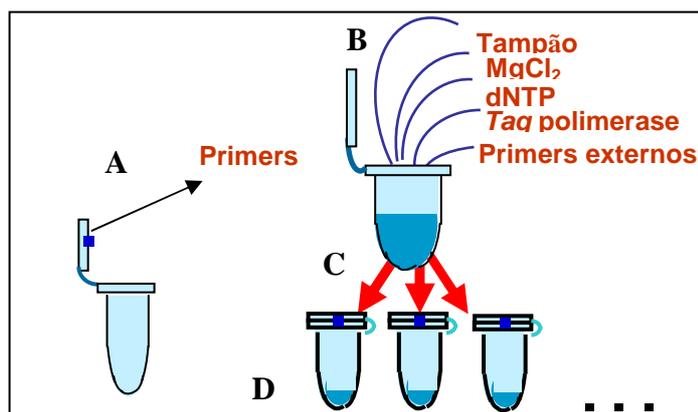


Figura 8: Esquema de preparo do *kit* 1 N-PCRTbU.

Fonte: elaborado pelo autor

Nota: **A:** Preparação prévia dos microtubos de reação (fixação dos *primers* internos); **B:** Preparação do *mix* de PCR para várias reações; **C:** Distribuição do *mix* nos microtubos de reação; **D:** microtubos prontos para reação.

- b) *Kit 2 N-PCRTbU* – Dez microtubos de reação com os *primers* internos fixados na tampa e um tubo contendo os demais reagentes da mistura de reação (Tampão, dNTP, MgCl₂; *primers* externos, *Taq* polimerase), distribuídos em alíquota para 10 reações (Figura 9).

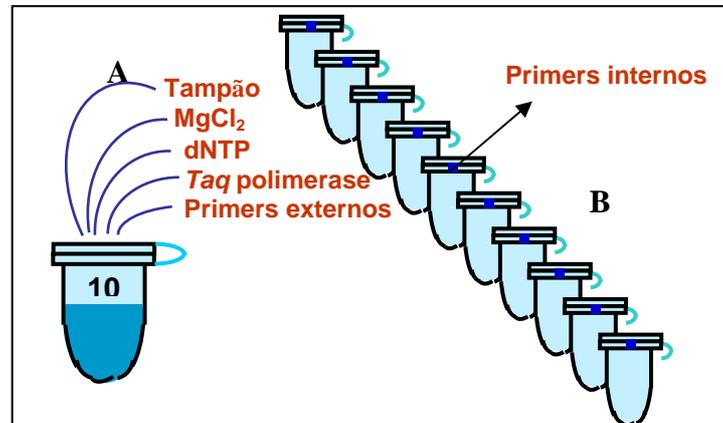


Figura 9: Esquema de preparo do *kit 2 N-PCRTbU*.

Fonte: elaborado pelo autor

Nota: **A:** Preparação do *mix* para dez reações; **B:** Microtubos de reação com *primers* internos pré-fixados.

Os *kits* nas duas condições, 1 e 2, foram acompanhados de tubos contendo DNA controle positivo e DNA controle negativo, alíquotados para 10 reações, já na concentração de uso.

7.5 Experimentos com M-PCR

Nas reações de M-PCR foram utilizados quatro pares de *primers*, para amplificação dos genes *pla*, *lcrV*, *caf1* e *irp2* e os fragmentos esperados para essa amplificação são de respectivamente: 920, 800, 500 e 300 pares de bases. Os *primers* apresentam os seguintes desenhos:

- caf1*: 5'-TTG GAA CTA TTG CAA CTG CTA 3' e 5' TTA GAT ACG GTT ACG GTT A-3' (LEAL *et al.*, 1996).
- lcrV*: 5'-AGA GCC TAC GAA CAA AAC CCA C-3' e 5'-GCA GGT GGT GGC AAA GTG AGA T-3' (MOTIN *et al.*, 1992);
- pla*: 5'-AAG TTC TAT TGT GGC AAC C-3' e 5'-GAA GCG ATA TTG CAG ACC-3' (SODEINDE; GOGUEN, 1988).

d) *irp2*: 5'-AAG GAT TCG CTG TTA CCG GAC-3' e 5'-TCG TCG GGC AGC GTT TCT TCT-3' (GUILVOUT *et al.*, 1993).

Os reagentes do *kit* M-PCR foram utilizados nas condições estabelecidas por Leal e Almeida (1999): Tampão (Tris-HCl 10mM pH 8,0; KCl 50mM; MgCl₂ 1,5mM); dNTP 200μM, 20pmol de cada *primer* e 1 U de *Taq* DNA polimerase. O DNA purificado das cepas *Y. pestis* P. Exu 390-2 e *Y. enterocolitica* 41, foi utilizado na concentração de 20ng como controle positivo e negativo, respectivamente. Os reagentes do *kit Taq Polymerase Recombinant* da Invitrogen foram utilizados em todas as reações de M-PCR. As reações foram realizadas em volume total de 25μl, sendo 15,5μl da mistura de reação, 1μl de DNA (20ng) e 8,5μl de água miliQ.

As amplificações foram realizadas em termociclador Biometra trio thermoblock e em termociclador Mastercycler eppendorf, programados para 30 ciclos constituídos de 1 minuto a 94°C para desnaturação; 1 minuto a 55°C para anelamento dos *primers* e 1 minuto a 72°C para extensão da fita de DNA, finalizando com uma etapa de extensão de 7 minutos a 72°C. Para termociclador com a tampa de proteção contra evaporação do *mix* de PCR, a temperatura ideal para tampa foi 99 °C.

O *kit* M-PCR também foi construído sob duas formas, para avaliar a melhor condição de estocagem:

a) *Kit* 1 M-PCR – Microtubos individuais com todos os reagentes (Tampão, dNTP, MgCl₂; *primers* e *Taq* polimerase), exceto o DNA e a água, prontos para a reação (Figura 10).

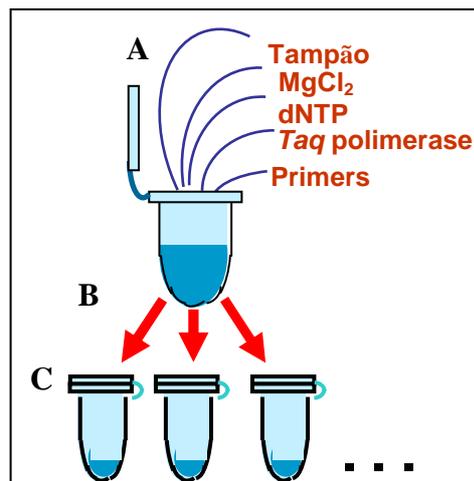


Figura 10: Esquema de preparo do *kit* 1 M-PCR.

Fonte: elaborado pelo autor

Nota: **A:** Preparação do *mix* de PCR para várias reações; **B:** Distribuição do *mix* nos microtubos de reação; **C:** Microtubos prontos para reação.

- b) *Kit 2* M-PCR – Microtubos individuais com todos os reagentes da mistura de reação (Tampão, dNTP, $MgCl_2$; *primers*, *Taq* polimerase), já na concentração de uso, distribuídos em alíquotas para 10 reações (Figura 11).

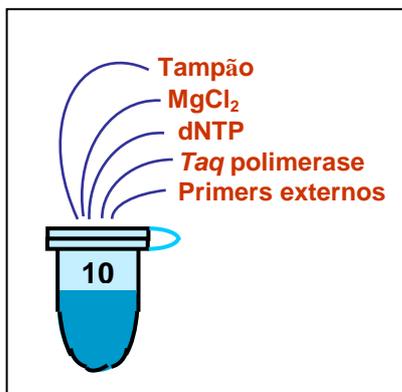


Figura 11: Esquema de preparo do *kit 2* M-PCR.
Fonte: elaborado pelo autor
Nota: Preparação do *mix* de PCR para 10 reações.

Também os *kits* M-PCR (*kit 1* e *kit 2*) foram acompanhados de tubos contendo DNA controle positivo e DNA controle negativo, alíquotados para 10 reações, já na concentração de uso.

7.6 Eletroforese

Os produtos de amplificação da PCR (*amplicons*) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo 10 μ l de *Sybr Safe* (Invitrogen, Brasil), em tampão Tris-Borato-EDTA sob voltagem de 100V, por cerca de uma hora. Em seguida visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e digitalizados em câmera Kodak® para análise. Foi utilizado como padrão de massa molecular o “100 base-pair DNA ladder” (Invitrogen, Brasil).

7.7 Reprodutibilidade das reações

A reprodutibilidade das reações com *kits* M-PCR e N-PCRTbU foi avaliada por repetição dos experimentos, no mesmo dia, utilizando as mesmas condições de reação. Bem

como no terceiro, quinto, décimo, vigésimo e trigésimo dias após a construção dos *kits* (reprodutibilidade inter-teste) e em todos os casos foi realizado duplicata do controle positivo para comparação dos resultados (reprodutibilidade intra-teste). Um controle negativo foi realizado em cada teste (Figura 12).

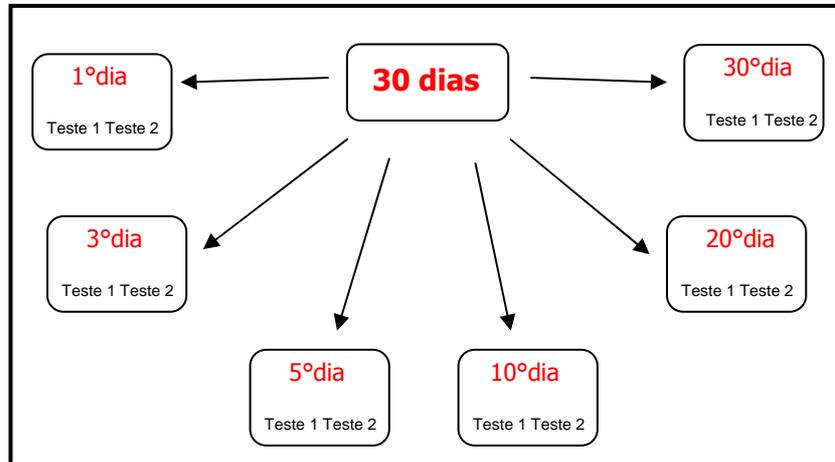


Figura 12: Esquema de realização dos testes para avaliação da reprodutibilidade das reações com os *kits* 1 e 2 N-PCRTbU e M-PCR.
Fonte: elaborado pelo autor

Devido a natureza dicotômica dos resultados, foi utilizado o Índice de Kappa de Cohen para avaliar a reprodutibilidade inter-observador (COHEN, 1960). Os resultados de todos os testes foram analisados por dois diferentes observadores. Foram comparados os resultados dos observadores entre si com os resultados esperados para os testes, através de uma tabela 2x2 (Tabela 1):

Tabela 1: Cálculo do Índice de Kappa de Cohen

		Observador I		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
Observador II	POSITIVO	a	b	a + b
	NEGATIVO	c	d	c + d
	TOTAL	a + c	b + d	N

Fonte: Ferreira; Avila (2001).

A fórmula geral para o cálculo do Índice de Kappa de Cohen é:

$$K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

, onde:

$P_o = \text{é a proporção de concordâncias observadas} = a + d / N$

$P_e = \text{é a proporção de concordâncias esperadas} = [(a + b)(a + c)] + [(c + d)(b + d)] / N^2$

Para as reações de M-PCR foram consideradas positivas apenas aquelas onde foram visualizados 4 fragmentos com 300, 500, 800 e 920 pares de bases. As reações em que foram visualizados apenas três desses fragmentos ou menos, foram consideradas negativas. Para as reações de N-PCRTbU foram consideradas positivas aquelas em que foi visualizado um fragmento de 500 pares de bases e negativas aquelas em que esse fragmento não foi identificado. Foi analisado em qual forma (*kit 1* ou *kit 2*) os *kits* N-PCRTbU e M-PCR forneceram reações mais reprodutíveis, utilizando a nomenclatura proposta por Landis e Koch (1977) que descreve a concordância associada com a estatística de Kappa (Tabela 2).

Tabela 2: Interpretação do Índice de Kappa de Cohen.

Índice de Kappa	Concordância
< 0,00	Pobre
0,00 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1,00	Quase perfeita

Fonte: Landis; Koch (1977).

7.8 Estabilidade dos *kits*

A estabilidade dos *kits* M-PCR e N-PCRTbU foi avaliada durante 12 meses. Os *kits* foram preparados, e em seguida armazenados em freezer (-20°C). Durante um ano, a cada trinta dias foram realizados experimentos para avaliar o funcionamento e a viabilidade desses *kits*. Tais experimentos foram feitos com suas respectivas duplicatas de controle positivo, as quais facilitaram as análises dos resultados (Figura 13).

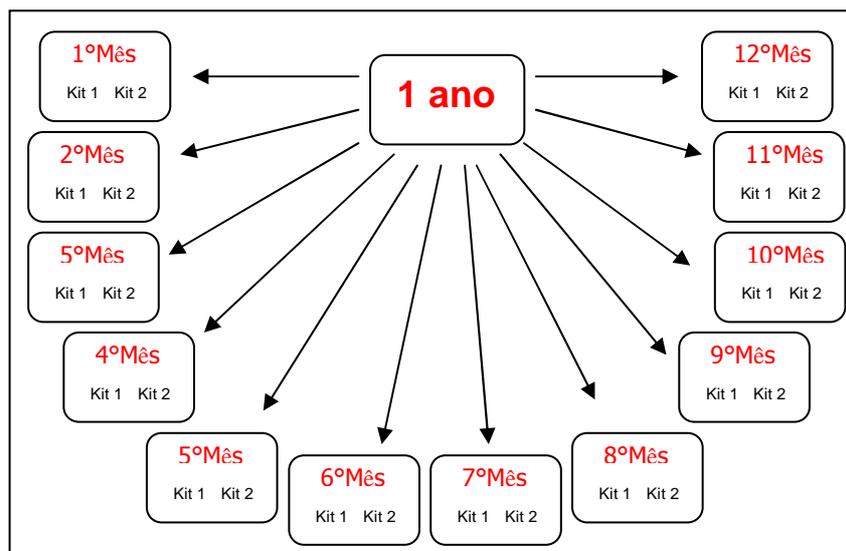


Figura 13: Esquema de realização dos testes para avaliação da estabilidade dos kits 1 e 2 N-PCRTbU e M-PCR.

Fonte: elaborado pelo autor

Durante a avaliação da estabilidade foi observado o desempenho dos kits M-PCR e N-PCRTbU sob as duas formas que foram construídos (*kit 1* e *kit 2*), para identificar qual delas confere maior estabilidade aos reagentes diante das circunstâncias especificadas. Nesses testes o *kit 2* sofreu três descongelamentos subsequentes. Também foi observado durante esse período a estabilidade do DNA controle positivo e controle negativo que acompanha os kits distribuídos em alíquotas para 10 reações.

7.9 Sensibilidade dos kits

A sensibilidade das reações utilizando os kits foi analisada após cinco meses de estocagem a -20°C . Alguns tubos com reagentes prontos para reação (*kit 1*) dos kits N-PCRTbU e M-PCR foram separados para avaliação da sensibilidade de suas reações, utilizando várias quantidades do DNA da cepa *Y. pestis* P. Exu 390-2 (5ng, 3ng, 1ng, 500pg, 200pg, 100pg e 10pg).

7.10 Avaliação da estabilidade dos kits com base nas condições de transporte

Para simular o transporte dos kits N-PCRTbU e M-PCR, foi analisado o acondicionamento em gelo seco. Esses experimentos foram realizados da seguinte forma: alguns tubos de reação pertencentes ao kit com reagentes prontos para reação (*kit 1*) e os tubos com DNA controle positivo e negativo foram separados em embalagens adequadas, em seguida armazenados em recipiente contendo sete quilos de gelo seco. A cada dia o recipiente era aberto rapidamente e alguns tubos eram retirados para realização das reações de PCR. Após quatro dias os tubos de reação restantes foram armazenados em freezer e testados nos dois meses seguintes.

Uma forma mais simples de transporte foi analisada para esses kits: transporte em temperatura ambiente, após liofilização do *mix* de reagentes. Esses experimentos também foram realizados apenas com o *kit 1* (N-PCRTbU e M-PCR). Em cada tubo contendo o *mix* de reação foi adicionado 5µl de trealose (T0167-25G/Sigma) 40% concentrada, esse carboidrato funciona como estabilizador da enzima *Taq* polimerase, durante o processo de liofilização. Após a adição de trealose ao *mix*, os reagentes foram submetidos a temperatura de -80°C por algumas horas, e em seguida levados para liofilização. Para o *kit* N-PCRTbU os *primers* internos foram fixados na tampa do microtubo antes da liofilização. Após esse procedimento alguns dos tubos com reagentes liofilizados foram armazenados a -20°C e outros foram armazenados em temperatura ambiente. Os kits foram testados nos primeiro, quinto, oitavo dias após a liofilização e em seguida uma vez por mês durante quatro meses. As reações de PCR foram realizadas após a reidratação do material seco com água mili Q suficiente para completar os 25µl para o M-PCR e 50µl para o N-PCRTbU, com a adição do DNA molde (20ng). O funcionamento dos kits liofilizados foi avaliado durante um período de quatro meses.

8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho não apresenta implicações éticas, uma vez que é de realização estritamente laboratorial e as cepas utilizadas para extração de DNA pertencem à coleção de *Yersinia spp.* do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, sendo provenientes de demanda espontânea.

9 RESULTADOS

9.1 Avaliação da reprodutibilidade das reações com o *kit* N-PCRTbU

Os resultados foram satisfatórios uma vez que, em todas as reações em que foi adicionado DNA da cepa *Y. pestis* P. Exu 390-2 (controle positivo) houve amplificação do segmento referente ao gene *caf1*, não havendo em nenhum dos casos amplificação de sequências inespecíficas. Foi observado em alguns testes que uma das reações positivas, da duplicata, apresentou fragmento um pouco menos visível que a outra, isso pode ser observado no experimento do 3º dia, teste 2 do *kit* 2 e do 10º dia, teste 2 do *kit* 1 (Figura 14).

No controle negativo do teste 1, *kit* 2, do 20º dia houve amplificação de um fragmento da mesma altura esperada para o gene *caf1* (500 pb), porém de visualização bem menos intensa que o controle positivo, dando indicações de uma contaminação. Nas demais reações em que foi adicionado DNA da cepa *Y. pestis* P. PB 881 (controle negativo), não ocorreu amplificação (Figura 14).

A análise estatística utilizando o Índice de Kappa de Cohen forneceu um valor numérico para a reprodutibilidade inter-observador. Foi realizado para cada condição do *kit* um total de 36 reações, em 24 delas foi adicionado DNA controle positivo e em 12, DNA controle negativo. O observador I identificou para o *kit* 1 25 reações com resultado positivo e 11 com resultado negativo para o gene *caf1*, uma reação positiva a mais que o resultado esperado. O observador II identificou 24 reações positivas e 12 negativas, o mesmo que o resultado esperado para essa avaliação. Os resultados dos dois observadores foram comparados entre si em uma tabela 2x2 (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação dos resultados dos observadores I e II para as reações com o *kit 1* N-PCRTbU

		Observador I		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
Observador II	POSITIVO	24	0	24
	NEGATIVO	1	11	12
	TOTAL	25	11	36

Utilizando a fórmula geral do Índice de Kappa de Cohen, o valor encontrado para reprodutibilidade do *kit 1* N-PCRTbU foi 0,93 que indica na tabela de Landis e Koch (1977) uma reprodutibilidade quase perfeita.

Para o *kit 2*, o observador I identificou 26 reações positivas e 10 negativas para o gene *caf1*, 2 reações positivas a mais que o valor esperado e o observador II identificou 24 reações positivas e 12 negativas, como o esperado (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação dos resultados dos observadores I e II para as reações com o *kit 2* N-PCRTbU

		Observador I		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
Observador II	POSITIVO	24	0	24
	NEGATIVO	2	10	12
	TOTAL	26	10	36

O valor de kappa encontrado foi 0,86. Esse valor designa na tabela de Landis e Koch também uma reprodutibilidade quase perfeita.

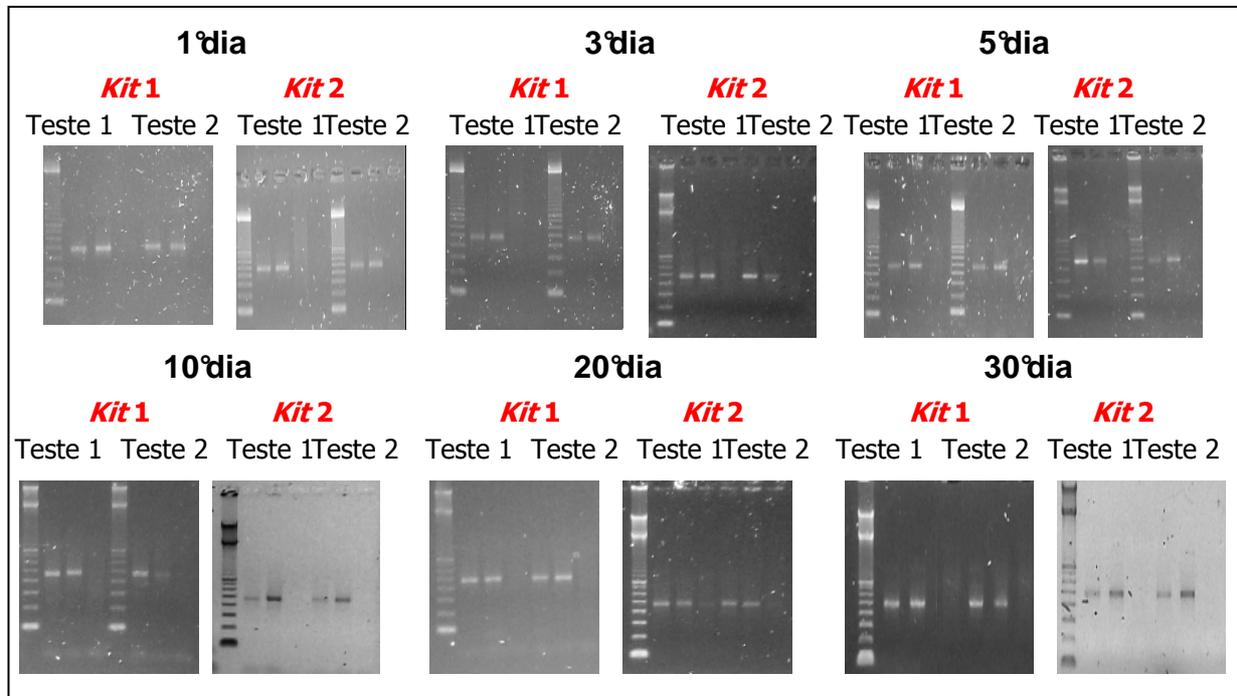


Figura 14: Produto da amplificação do gene *caf1* nas reações com o kit N-PCRTbU nas formas 1 e 2 (*kit 1* e *kit 2*), para a avaliação da reprodutibilidade.

Nota: Testes apresentando controle positivo das reações em duplicata (cepa *Y. pestis* P. Exu 390-2), mais controle negativo (cepa *Y. pestis* P. PB 881).

9.2 Avaliação da reprodutibilidade das reações com o *kit* M-PCR

A reprodutibilidade das reações com o *kit* M-PCR foi avaliada do mesmo modo que para o *kit* N-PCRTbU e também foram obtidos resultados adequados.

Em todas as reações onde foi adicionado o DNA da cepa *Y. pestis* P. Exu 390-2 (controle positivo) houve amplificação dos quatro fragmentos referentes aos genes *pla*, *lcrV*, *caf1* e *irp2*, com 920, 800, 500 e 300 pares de bases respectivamente. Em nenhum dos casos foi visualizada amplificação de fragmentos inespecíficos. Assim como no *kit* N-PCRTbU, algumas duplicatas apresentaram em uma de suas reações positivas fragmentos menos nítidos que a outra. No *kit* 1 o fragmento que frequentemente aparece mais discreto é o que representa o gene *caf1*, como é o caso dos testes 1 e 2 no experimento do 1º dia. Já para o *kit* 2, os fragmentos que algumas vezes se mostraram mais discretos foram os referentes aos genes *pla* e *lcrV*, isso ocorre por exemplo nos testes 1 e 2 do 5º dia. Não houve nenhum tipo de amplificação nas reações em que foi adicionado DNA da cepa *Y. enterocolítica* 41 (Figura 15).

Na reprodutibilidade inter-observador, obtida através do Índice de Kappa de Cohen, os observadores participantes foram os mesmos que analisaram as reações do *kit* N-PCRTbU. Tanto para o *kit* 1 M-PCR quanto para o *kit* 2, era esperado um total de 24 reações positivas e 12 reações negativas. Para o *kit* 1, o observador I identificou 24 reações positivas e 12 negativas, como esperado, já o observador II identificou 20 reações positivas e 16 negativas. Os resultados identificados pelos observadores foram comparados em uma tabela 2x2 (Tabela 5):

Tabela 5: Comparação dos resultados dos observadores I e II para as reações com o *kit* 1 M-PCR.

		Observador I		TOTAL
		POSITIVO	NEGATIVO	
Observador II	POSITIVO	20	0	20
	NEGATIVO	4	12	16
	TOTAL	24	12	36

O valor de kappa encontrado foi 0,77. Esse valor indica na tabela de Landis e Koch, uma reprodutibilidade substancial.

Após análise dos resultados das reações com o *kit* 2, o observador I identificou 23 reações positivas e 13 reações negativas e o observador II identificou 22 reações positivas e 14 negativas (Tabela 6).

Tabela 6: Comparação dos resultados dos observadores I e II para as reações com o *kit 2* M-PCR.

		Observador I		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
Observador II	POSITIVO	22	0	22
	NEGATIVO	1	13	14
	TOTAL	23	13	36

O valor de kappa obtido foi 0,94 que designa na tabela de Landis e Koch uma reprodutibilidade quase perfeita.

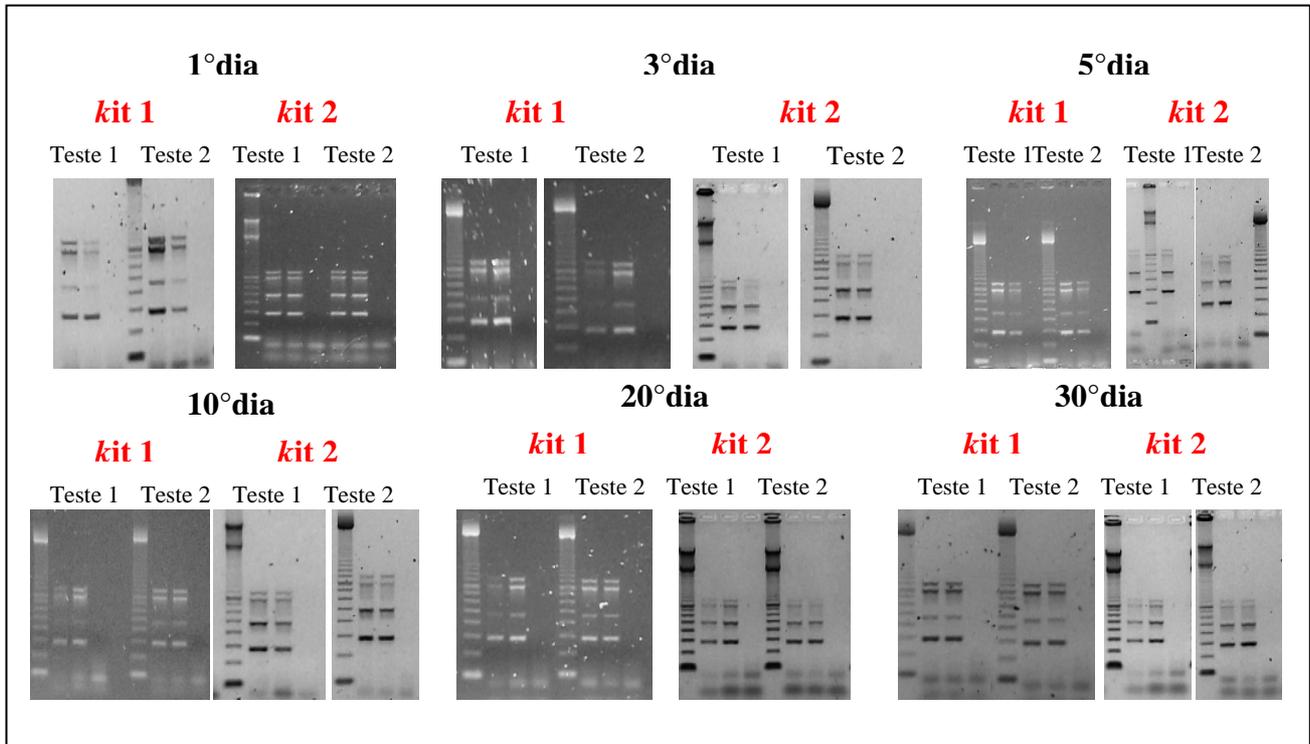


Figura 15: Produtos da amplificação dos genes *pla*, *lcrV*, *cafI* e *irp2* nas reações do kit M-PCR, nas formas 1 e 2 (*kit 1* e *kit 2*), para a avaliação da reprodutibilidade.

Nota: Testes apresentando controle positivo das reações em duplicata (cepa *Y. pestis* P. Exu 390-2), mais controle negativo (cepa *Y. enterocolitica* 41).

9.3 Avaliação da estabilidade do *kit* N-PCRTbU

A estabilidade do *kit* N-PCRTbU (*kit* 1 e *kit* 2) foi avaliada durante um ano, estando os mesmos armazenados a -20°C. Foram realizados experimentos mensais para avaliar o funcionamento dos *kits* nas condições especificadas. (Figura 16).

Como resultados desses testes, foi observado que em todas as reações em que foi adicionado DNA controle positivo (cepa *Y. pestis* P. Exu 390-2), ocorreu amplificação do fragmento referente ao gene *caf1*, e as reações com DNA controle negativo (cepa *Y. pestis* P. PB 881), não apresentaram amplificação. Não houve amplificação de fragmentos inespecíficos em nenhum dos casos.

Os *kits* não demonstraram alteração no funcionamento de seus reagentes com o passar dos meses. Também não houve diferença significativa entre o funcionamento dos *kits* 1 e 2.

O *kit* na condição 2, em que os reagentes são alíquotados para 10 reações, passaram por três descongelamentos subsequentes, entretanto os resultados foram semelhantes tanto para reações realizadas após o primeiro descongelamento quanto para as realizadas após o terceiro descongelamento.

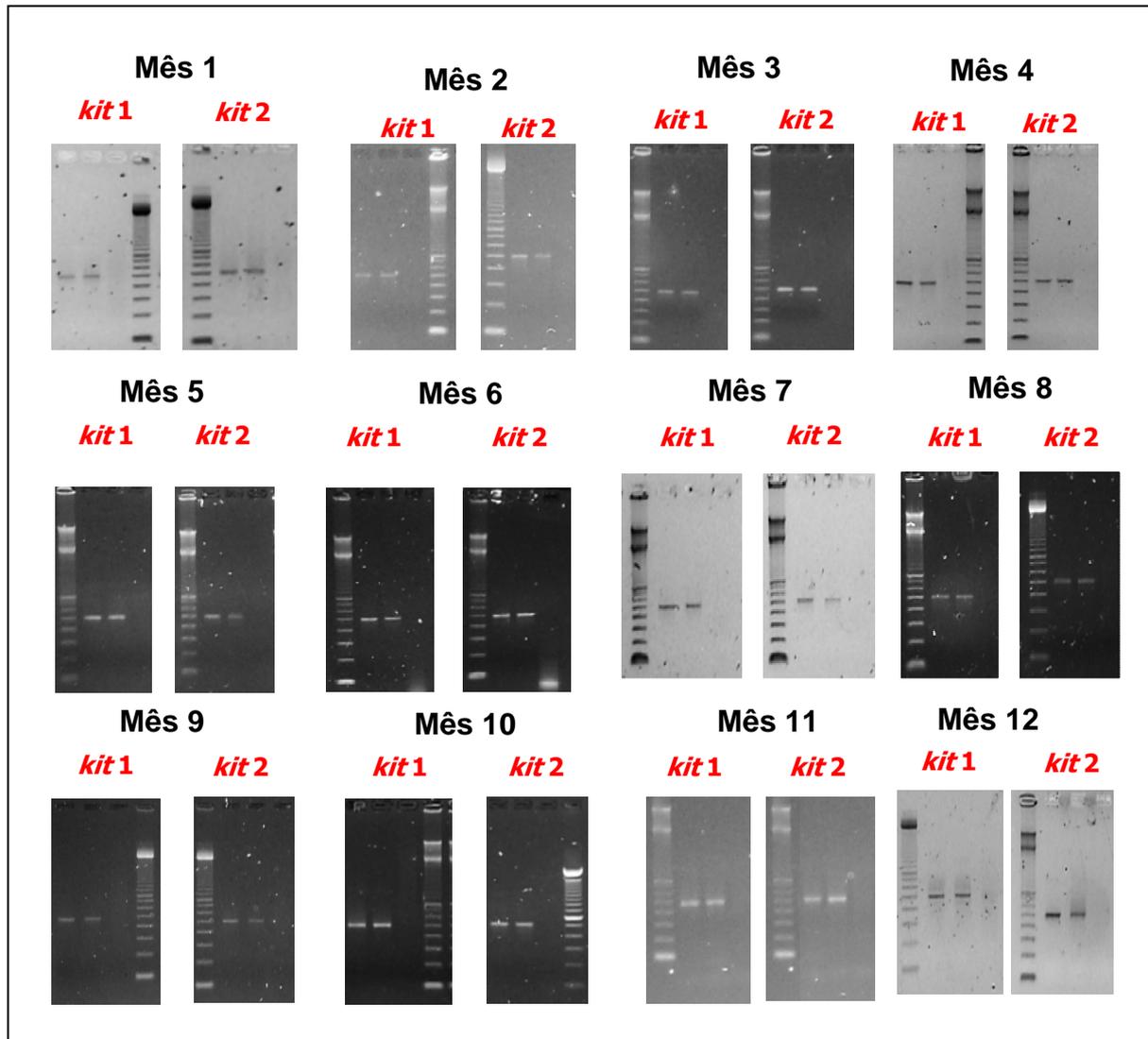


Figura 16: Produto da amplificação do gene *cafI* nas reações do *kit* N-PCRTbU nas formas 1 e 2 (*kit* 1 e *kit* 2), para a avaliação da estabilidade.

Nota: Controle positivo das reações em duplicata (cepa *Y. pestis* P. EXU 390-2), mais controle negativo (cepa *Y. pestis* P. PB 881).

9.4 Avaliação da estabilidade do *kit* M-PCR

Também para o *kit* M-PCRTbU (*kit* 1 e *kit* 2) foram realizados experimentos mensais para avaliar a estabilidade, estando armazenados a -20°C pelo período de um ano.

As amplificações das sequências correspondentes aos genes *pla*, *lcrV*, *caf1* e *irp2* foram visualizadas nitidamente em todas as reações em que foi adicionado DNA controle positivo (cepa *Y. pestis* P. Exu 390-2). Não houve qualquer tipo de amplificação inespecífica. Não houve amplificação nas reações em que foi adicionado DNA da cepa *Y. enterocolitica* 41 (Figura 17).

Foi observado durante a avaliação da estabilidade que o *kit* M-PCR teve desempenho um pouco melhor quando comparado com a avaliação da reprodutibilidade, apresentando resultados mais uniformes quanto a nitidez dos fragmentos amplificados nas reações com DNA controle positivo.

Não houve alteração nos resultados das reações com o passar dos meses, assim como também não houve diferenças significativas no funcionamento dos *kits* nas formas 1 e 2 que foram preparados.

Nas reações com o *kit* 2, onde os reagentes foram descongelados 3 vezes, para realização dos testes, houve amplificação dos controles positivos do primeiro ao último descongelamento dos reagentes.

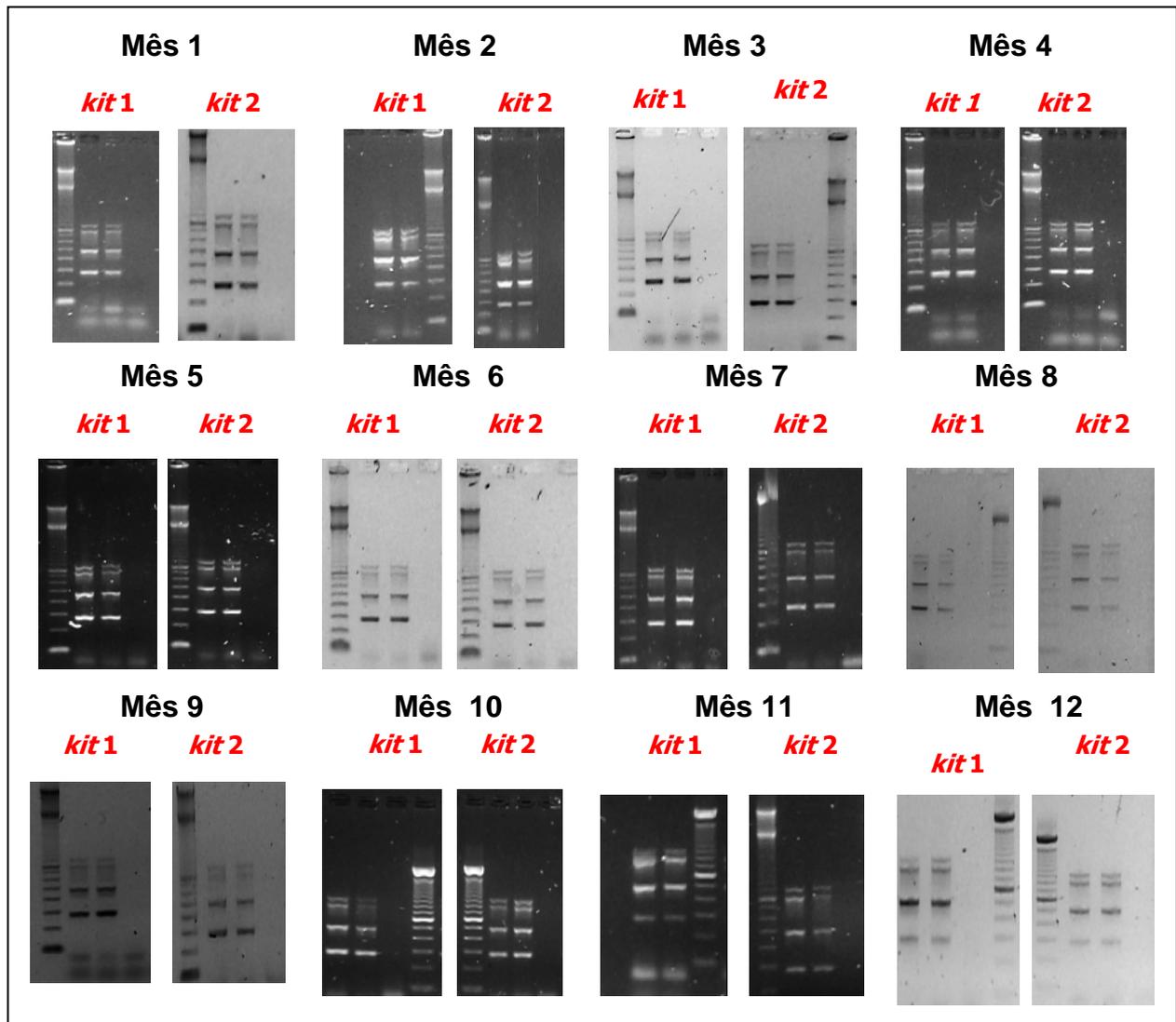


Figura 17: Produtos da amplificação dos genes *pla*, *lcrV*, *caf1* e *irp2* nas reações do kit M-PCR, condições 1 e 2 (*kit 1* e *kit 2*), para a avaliação da estabilidade.

Nota: Controle positivo das reações em duplicata (cepa *Y. pestis* P. Exu 390-2), mais controle negativo (cepa *Y. enterocolitica* 41).

9.5 Avaliação da sensibilidade dos kits

Os microtubos com reagentes prontos para reação, referentes aos kits 1 N-PCRTbU e M-PCR, foram avaliados quanto a sensibilidade após 5 meses de estocagem a -20°C . Tanto para o kit N-PCRTbU quanto para o kit M-PCR houve amplificação até 10pg de DNA extraído da cepa *Y. pestis* P. Exu 390-2 (Figura 18).

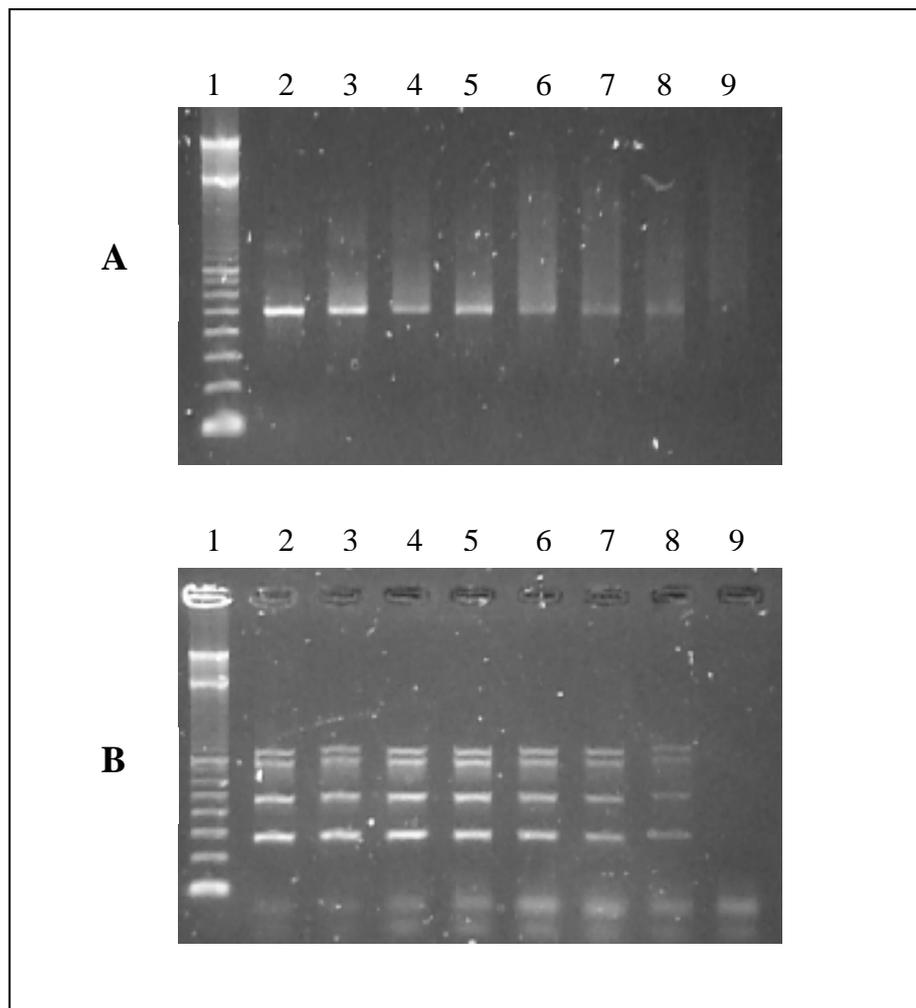


Figura 18: Produtos do N-PCRTbU e M-PCR com diferentes quantidades de DNA da cepa *Y. pestis* P. Exu 390-2.

Nota: (A) N-PCRTbU – Linhas: 1: 100pb DNA ladder, 2: 5ng, 3: 3ng, 4: 1ng, 5: 500pg, 6: 200pg, 7: 100pg, 8: 10pg, 9: Controle negativo; (B) M-PCR – Linhas: 1: 100pb DNA ladder, 2: 5ng, 3: 3ng, 4: 1ng, 5: 500pg, 6: 200pg, 7: 100pg, 8: 10pg, 9: Controle negativo.

9.6 Avaliação da estabilidade dos kits com base nas condições de transporte

9.6.1 Transporte em gelo seco

Como resultados dos testes com os kits na condição 1 (*kit 1*) armazenados em gelo seco durante quatro dias, em todas as reações em que foi adicionado o DNA da cepa *Y. pestis* P. Exu 390-2 (controle positivo) houve amplificação dos fragmentos alvo. Não ocorreu amplificação em nenhum controle negativo. Os testes foram realizados a cada dia e não houve alteração no funcionamento dos kits entre o primeiro e o último dia de armazenamento (Figura 19). Os testes realizados nos dois meses seguintes após os tubos restantes serem armazenados em freezer, mostraram também resultados adequados (dados não mostrados).

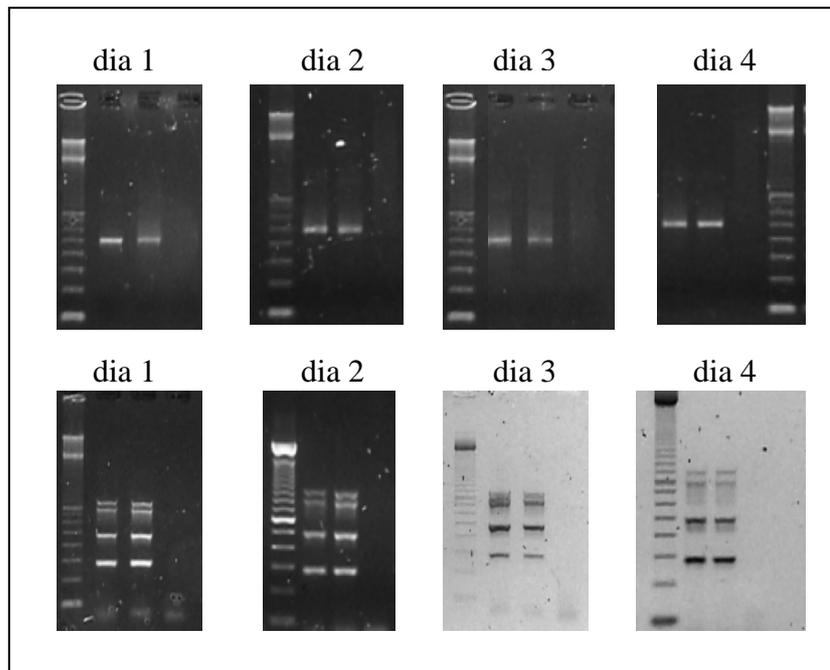


Figura 19: Produto das reações com kits N-PCRTbU e M-PCR armazenados em gelo seco por 4 dias. Nota: Testes apresentando controle positivo das reações em duplicata, mais controle negativo.

9.6.2 Transporte em temperatura ambiente com reagentes liofilizados.

Para o transporte em temperatura ambiente, após adição de trealose, os tubos prontos para reação (*kits* 1 N-PCRTbU e M-PCR) foram submetidos a liofilização. Alguns desses tubos foram mantidos em temperatura ambiente e outros foram armazenados em freezer e durante quatro meses esses *kits* foram testados.

Até o 30° dia os *kit* N-PCRTbU e M-PCR, armazenados tanto no freezer quanto em temperatura ambiente, apresentaram bom funcionamento. Após 60 dias apenas nas reações com os *kits* armazenados em freezer, foi visualizado amplificação das sequências alvo. Os *kits* armazenados em temperatura ambiente não apresentaram funcionamento adequado a partir das reações realizadas no 60° dia. (Figuras 20 e 21).

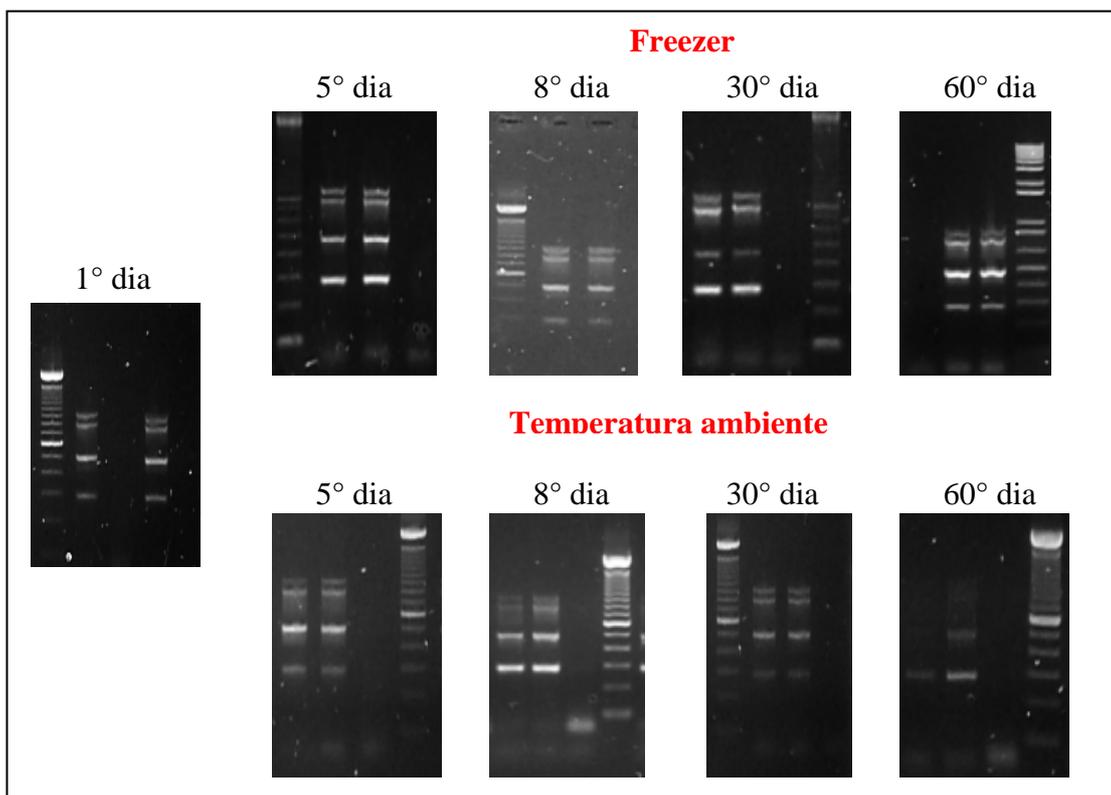


Figura 20: Produto da M-PCR com *kits* liofilizados após adição de trealose ao *mix* de reação.
Nota: Testes apresentando controle positivo das reações em duplicata (cepa *Y. pestis* P. Exu 390-2), mais controle negativo (cepa *Y. enterocolitica* 41).

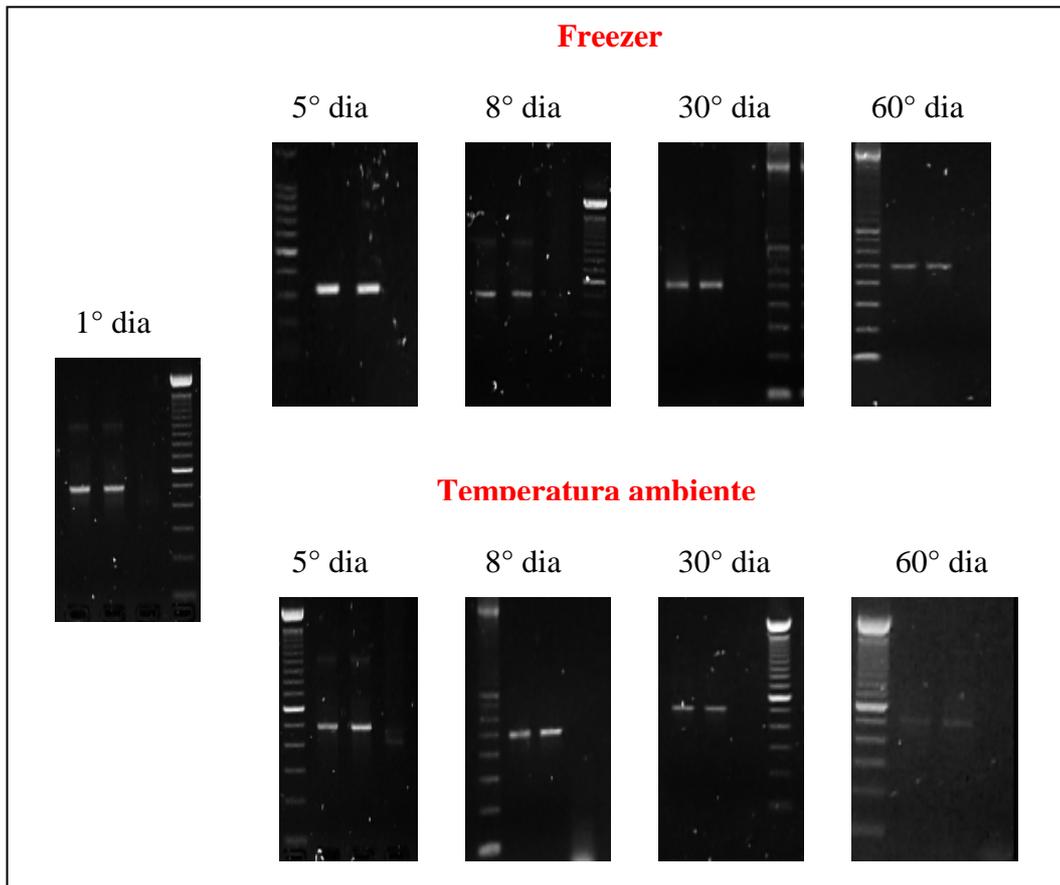


Figura 21: Produto do N-PCRTbU com *kits* liofilizados após adição de trealose ao *mix* de reação. Nota: Controle positivo das reações em duplicata (cepa *Y. pestis* P. EXU 390-2), mais controle negativo (cepa *Y. pestis* P. PB 881).

10 DISCUSSÃO

Várias técnicas baseadas em PCR foram desenvolvidas e aplicadas na identificação da *Y. pestis* (LEAL; ALMEIDA, 1999; LEAL *et al.*, 1996; LOIEZ *et al.*, 2003). Apesar de serem bastante sensíveis e fornecerem resultados rápidos, o preparo do *mix* de PCR ainda desperdiça tempo, além de está sujeito a riscos de contaminação, erros de pipetagem e outros problemas relacionados aos lotes de reagentes (RAMANUJAN, 1993). Pensando nisso, no presente trabalho foi estudada a possibilidade de desenvolver *kits* de diagnóstico baseados nas técnicas de N-PCRTbU e M-PCR para serem aplicados no diagnóstico de peste. Estas técnicas são bastante sensíveis e específicas e demonstraram eficácia na identificação de *Y. pestis*.

A reprodutibilidade pode ser definida, segundo ten Bosch e Angmar-Mansson (2000) como sendo a capacidade de um método em produzir os mesmos resultados sob diferentes circunstâncias. Os resultados da avaliação da reprodutibilidade das reações com os *kits* N-PCRTbU e M-PCR demonstraram que nas duas formas que foram construídos (reagentes prontos e reagentes em alíquotas para dez reações), foram reprodutíveis de acordo com Landis e Koch (1977). Apesar disso, recomenda-se que na rotina de vigilância em peste, as reações sejam realizadas em duplicata, a fim de não haver dúvidas na análise dos resultados, como ocorreu em alguns testes em que as reações positivas de uma mesma duplicata, apresentaram fragmentos visualizados com menos intensidade que na outra. Em outra situação, para evitar o desperdício de reagentes, as reações podem ser repetidas caso apresentem dúvida quanto à visualização dos fragmentos.

Segundo a Anvisa, estabilidade é a qualidade de um produto referente à manutenção de suas características essenciais durante um espaço de tempo, em condições previamente estabelecidas (BRASIL, 2005a). O teste de estabilidade é um conjunto de avaliações planejadas para obter informações sobre o prazo de validade de determinado produto, correspondente a um período para a sua utilização, sob condições ideais de armazenamento. Deste modo, os *kits* de diagnóstico são testados para garantir que a mesma amostra dê o mesmo resultado, independentemente de o *kit* ser novo ou já próximo do fim da validade (BRASIL, 2005b). Um *kit* de PCR transcriptase reversa, para detecção do vírus da dengue, foi avaliado após estocagem em temperatura ambiente, refrigerador e freezer e os resultados indicaram que o acondicionamento ideal para esse *kit* foi a -20°C por apenas três dias (OOI *et al.*, 2005). Diferentemente, os *kits* N-PCRTbU e M-PCR nas formas 1 e 2, se mostraram estáveis quando armazenados a -20°C por pelo menos um ano.

Mendes *et al.* (2007) conseguiram que um *kit* de Multiplex-nested PCR em tubo único, para diagnóstico de cólera, mantivesse estabilidade a -20°C por 5 meses, mas sem a presença da enzima *Taq* DNA polimerase no *mix* de reagentes armazenado. Como os *kits* N-PCRTbU e M-PCR foram construídos na presença da *Taq* polimerase e sabendo de sua sensibilidade frente a mudanças de temperatura, uma das maiores dúvidas para construção dos mesmos foi se essa enzima resistiria à estocagem por longo período, junto aos demais reagentes do *mix* ou se ela resistiria ao processo de congelamento e descongelamento sucessivos, como ocorreu na condição em que os reagentes do *kit* foram aliquotados para dez reações. Mesmo assim foi verificado que a enzima não perdeu a atividade diante dessas circunstâncias.

Apesar da estabilidade dos *kits* nas suas duas formas de preparo, foi observado que o *kit* 1 ofereceu algumas vantagens diante do *kit* 2, tais como menor tempo de preparo na reação final, pois os reagentes já se encontram aliquotados para uma reação; menor risco de contaminação, visto que os tubos são abertos apenas uma vez, para adição de DNA e água, e por conta disso seu manuseio é bem mais simples que o *kit* 2, onde dependendo do número de reações realizadas por vez, os tubos podem ser abertos duas ou mais vezes.

Durante os testes para avaliar a estabilidade dos *kits* foram observados resultados melhores quando comparados para os testes da reprodutibilidade, com fragmentos quase sempre nítidos e na maioria das vezes esse aspecto foi mais uniforme entre as reações positivas de uma mesma duplicata. Uma observação a ser feita é que antes de iniciar os testes para avaliação da estabilidade, o DNA da cepa *Y. pestis* P. Exu 390-2, usado como controle positivo para as reações, foi novamente extraído, uma vez que a última extração havia sido realizada a cerca de um ano. Acredita-se que o processo de congelamento e descongelamento do DNA por repetidas vezes, ou até mesmo como observado por Melo *et al.* (2003) o longo período de estocagem pode ter ocasionado degradação desse DNA, fato que pode ter influenciado os resultados obtidos durante os testes da reprodutibilidade. Esse acontecimento foi importante para algumas observações que foram feitas, pois na rotina de vigilância em peste, muitas vezes no material biológico recebido para análise, o conteúdo genético pode não ter a qualidade adequada para a realização dos testes, e por conta disso o resultado pode não ser tão evidente, daí a necessidade de realizar as reações em duplicata, como recomendado anteriormente.

O limiar de detecção das reações com o *kit* 1 (N-PCRTbU e M-PCR) foi satisfatório. O longo período de estocagem não reduziu a sensibilidade desses *kits*. Tanto nas reações com o *kit* N-PCRTbU, quanto com o *kit* M-PCR, houve amplificação até 10pg de DNA. Essa sensibilidade foi a mesma encontrada para o N-PCRTbU preparado a fresco (SOUZA *et al.*, 2007).

O *kit 1* apresentou-se como a forma mais adequada para estocagem dos reagentes, embora o *kit 2* também tenha se mostrado estável nas condições especificadas. Assim, o *kit 1* foi escolhido para ser testado quanto a melhor forma de transporte, comparando o transporte em gelo seco com o transporte em temperatura ambiente. O acondicionamento em gelo seco se mostrou eficiente por pelo menos quatro dias em que os reagentes dos *kits* se mantiveram em funcionamento normal, mesmo após serem retirados do gelo seco e armazenados em freezer por pelo menos dois meses. No entanto, para um transporte de quatro dias é necessário em média 7 kg de gelo seco, o que significa um custo razoavelmente alto, além da necessidade de um espaço maior quando comparado ao armazenamento em temperatura ambiente, onde são transportados apenas os próprios tubos do *kit*, embalados adequadamente.

Uma boa alternativa para transporte em temperatura ambiente foi utilizada nesse trabalho, tendo por base a liofilização do *mix* de PCR, após adição de trealose. A trealose é um dissacarídeo não redutor constituído de duas unidades de glicose que atua como defesa natural de nematódios, plantas do deserto, leveduras, fornecendo resistência celular contra vários tipos de *stress* ambiental (ALCARDE; BASSO, 1997). A correlação entre a quantidade de trealose em uma célula e a sua capacidade de resistir ao congelamento e a desidratação tem levado alguns pesquisadores a usar esse dissacarídeo para inúmeras finalidades, tais como: preservação de material biológico, conservação de vacinas e de alimentos desidratados, além de permitir a liofilização de inúmeros materiais, atuando como um crioprotetor (CAMPOS, 2006). A liofilização é um método de preservação bastante efetivo baseado na remoção do vapor de água diretamente de amostras congeladas e continuada secagem sob vácuo, até a produção de material estável (ALCARDE; BASSO, 1997). Alguns agentes crioprotetores são indicados com sucesso para a liofilização, como glicerol, leite desnatado, inositol, sacarose, rafinose e trealose (PODLECH *et al.* 1996).

Utilizando o método da liofilização dos reagentes após adição de trealose, Qu *et al.* (2010) conseguiram que o *mix* de uma PCR em tempo real usada na identificação de *Y. pestis*, mantivesse bom funcionamento após estocagem em temperatura ambiente por 79 dias. Os *kits* N-PCRTbU e M-PCR, tanto armazenados em freezer como em temperatura ambiente mantiveram funcionamento adequado até 30 dias após a liofilização de seu *mix* de reagentes, entretanto nas reações realizadas após 60 dias, apenas os tubos de reação armazenados em freezer apresentaram bom funcionamento. Diante disso é recomendado que após o transporte em temperatura ambiente, chegando ao seu destino os *kits* devem ser armazenados em freezer, para que seus reagentes permaneçam estáveis.

Sintetizando, os *kits* N-PCRTbU e M-PCR em suas duas formas de preparo *kit 1* e *kit 2*, mostraram-se estáveis e adequados para uso na rede de vigilância em peste, entretanto o *kit 1* apresenta maior praticidade e portanto menores chances de erros, sendo assim a forma mais conveniente para construção dos *kits*. Por outro lado, a estocagem na forma liofilizada oferece melhores condições de transporte, sendo então indicada no preparo do *kit 1*.

A existência desses *kits* terá muita importância para uso pelo Serviço Nacional de Referência em Peste, além da possibilidade de serem distribuídos para outros laboratórios, descentralizando o diagnóstico da doença e aumentando assim a eficiência da vigilância.

11 CONCLUSÕES

- a) Os *kits* N-PCRTbU e M-PCR se mostraram adequados para uso na rede de vigilância em peste;
- b) As reações com os *kits* N-PCRTbU e M-PCR mostraram reprodutibilidade aceitável tanto na forma 1 quanto na forma 2 que foram construídos;
- c) As reações com os *kits* N-PCRTbU e M-PCR devem ser realizadas em duplicata;
- d) Mesmo com a *Taq* polimerase armazenada junto aos demais reagentes do *mix*, os *kits* N-PCRTbU e M-PCR se mostraram estáveis em estocagem a -20°C por pelo menos doze meses;
- e) O congelamento da mistura de reação por longo período não reduziu a sensibilidade das técnicas de N-PCRTbU e M-PCR;
- f) Os processos de congelamento e descongelamento do *mix* de reação, por repetidas vezes, não interferiu no funcionamento dos *kits*;
- g) O desempenho dos *kits* nas duas formas em que foram construídos foi similar, entretanto o *kit* 1 foi considerado a forma mais conveniente para uso, devido a maior praticidade no preparo da reação final e menores chances de erros.
- h) A liofilização, após adição de trealose aos reagentes se mostrou melhor que o acondicionamento em gelo seco para o transporte desses *kits*.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C. *et al.* Single-tube Nested PCR using immobilized internal primers. **BioTechniques**, Natick, v. 33, p. 1210-1214, 2002.
- ACHTMAN, M. *et al.* *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recent emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 14043-14048, 1999.
- ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 54, p. 189-194, 1997.
- ALMEIDA, A. M. *et al.* Isolamento da *Yersinia pestis* nos focos pestosos no Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 27, p. 207-218, 1985.
- ALMEIDA, A. M. *et al.* Estudos bacteriológicos e sorológicos de um surto de peste no estado da Paraíba, **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, p. 249-256, 1989.
- ALMEIDA, A. M. *et al.* Peste. In: COURA, J.R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. v. 2, p. 1509-1521.
- ALMEIDA, A. M. P. *et al.* Contribuição para o diagnóstico da peste. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 40, p. 53-55, 2007.
- ARAGÃO, A. I. *et al.* Vigilância da peste no estado do Ceará: 1990-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 35, p. 143-148, 2002.
- ARAGÃO, A. I. *et al.* Tendência secular da peste no estado do Ceará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, p. 715-724, 2007.
- BERG, J. *et al.* Single tube two-round polymerase chain reaction using the LightCycler™ instrument. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 20, p. 71-75, 2001.
- BRASIL. Consulta Pública nº 42, de 20 de maio de 2005. **Diário Oficial [República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 maio, 2005a. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B10480-2-0%5D.PDF>>. Acesso em 11 maio. 2010.

BRASIL. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. **Diário Oficial [República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 ago, 2005b. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word=>>. Acesso em: 11 maio. 2010.

BRUBAKER R. R. Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 4, p. 309-324, 1991.

BRUBAKER R. R. The recent emergence of plague: a process of felonious evolution. **Microbial Ecology**, New York, v. 47, p. 293-299, 2004.

BULMAN, J. S.; OSBORN, J. F. Measuring diagnostic consistency. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 166, p. 377-381, 1989.

CAMPOS, S. **Estudo do metabolismo de trealose**, 2006. Disponível em: <<http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/18696>>. Acesso em: 8 jul. 2010.

CARNIEL, E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. **Microbes and infection**, Paris, v. 3, p. 561- 569, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (USA), **Plague**, 2005. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/plague/p1.htm>>. Acesso em: 6 maio 2010.

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales, **Educational and Psychological Measurement**, Durham, v.20, p. 37-46, 1960.

CORNELIS, G. R. Molecular and cell biology aspects of plague. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 8778-8783, 2000.

CHU, M. **Laboratory manual of plague diagnosis tests**, Geneve, World Health Organization, 2000.

DENG, W. *et al.* Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, p. 4601-4611, 2002.

DU, Y. *et al.* Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, p. 1453-1460, 2002.

ERLICH, H. A. *et al.* Recent advances in the Polymerase Chain Reaction, **Science**, Washington, v. 252, p. 1643-1651, 1991.

FARIAS, A. C. A. Avaliação das técnicas Multiplex-PCR e Nested-PCR em tubo único no diagnóstico da Peste em amostras biológicas obtidas em campo. Reunião Anual de Iniciação Científica, 14., 2006, Rio de Janeiro. **Trabalhos apresentados**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006. 1 CD ROOM.

FARIAS, A. C. A. Avaliação das técnicas Multiplex-PCR e Nested-PCR em tubo único no diagnóstico da Peste em amostras biológicas obtidas em campo. Reunião Anual de Iniciação Científica, 15., 2007, Rio de Janeiro. **Trabalhos apresentados**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2007. 1 CD – ROOM.

FERREIRA, A. W.; AVILA, S. L. Parâmetros para validação de um teste sorológico. In: _____. **Diagnóstico Laboratorial**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2001. cap.1, p. 3-8.

FILIPPOV, A. A. *et al.* Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 67, p. 45-48, 1990.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Peste In: _____. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2002. v. 2, p. 641-642.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Peste In: _____. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2005. p. 574-586.

GAGE, K. L.; KOSOY, M. Y. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 50, p. 505-528, 2005.

GOOKIN, J. L. *et al.* Single- tube nested PCR for detection of *Trichomonas faetus* in feline faces. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington , v. 40, p. 4126-4130, 2002.

GUILVOUT, I. *et al.* High-molecular-weight protein 2 of *Yersinia enterocolitica* is homologous to *angR* of *Vibrio anguillarum* and belongs to a family of proteins involved in nonribosomal peptide synthesis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, p. 5488-5504, 1993.

HERRMANN, B. *et al.* Detection of *Neisseria gonorrhoeae* from air-dried genital samples by single-tube nested PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 2548-2551, 1996.

HIGGINS, R. Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: Bartonellosis, Leptospirosis, Lyme Borreliosis, Plague. **Revue Scientifique et Technique Office International Epizooties**, Paris, v. 23, p. 569-581, 2004.

HINNEBUSH, B. J. *et al.* Role of *Yersinia murine* toxine in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. **Science**, Washington, v. 296, p. 733-735, 2002.

INGLESBY, T. V. *et al.* Plague as a Biological Weapon. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 283, p. 2281-2290, 2000.

KARIMI, Y, *et al.* Diagnostic rapid de i' infection pesteuse au laboratoire. **Bulletin de la Soci   de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, Paris, v. 71, p. 45-48, 1978.

KINGMAN, A. A procedure for evaluating the reability of a gingivitis index. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 13, p. 385-391, 1986.

KONEMAN, E. W. *et al.* Métodos moleculares em microbiologia cl  nica In: _____. **Diagnóstico Microbiol  gico**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. cap. 1, p. 42-58.

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

LEAL-BALBINO, T. C. *et al.* Differences in the Stability of the Plasmids of *Yersinia pestis* Cultures in Vitro: Impact on Virulence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 727-732, 2004.

LEAL-BALBINO, T. C. *et al.* Peste e Tularemia. In: MARCONDES, C. B. **Doenças transmitidas e causadas por Artrópodes**. São Paulo: Atheneu, 2009. cap . 5, p. 69-83.

LEAL, N. C. *et al.* A simple PCR-based procedure for plague diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 371-373, 1996.

LEAL, T. C. *et al.* Marcadores de patogenicidade em *Yersinia enterocolitica* O:3 isoladas de suínos do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 19-24, 1997.

LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 41, p. 339-342, 1999.

- LEAL, N. C. *et al.* Homology among extra cryptic DNA bands and the typical plasmids in Brazilian *Yersinia pestis* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 20-24, 2000.
- LLOP, P. *et al.* Development of a highly sensitive nested PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 2071-2078, 2000.
- LOIEZ, C. *et al.* Detection of *Yersinia pestis* in sputum by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 4873-4875, 2003.
- MATHIS, A. *et al.* Reliable one-tube nested PCR for detection and SSCP-typing of *Pneumocystis carinii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Cincinnati, v. 43, p. 7S, 1996.
- MELO A. C. *et al.* Retrospective study of a plague outbreak by multiplex-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, p. 361-364, 2003.
- MENDES C. L. *et al.* Development of a multiplex single-tube nested PCR (MSTNPCR) assay for *Vibrio cholerae* O1 detection. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.72, p. 191-196, 2007.
- MERHEJ V. *et al.* *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 779-784, 2008.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). A peste humana In: _____. **Manual de Vigilância e Controle da Peste**, Brasília, DF, 2008. p. 33-42.
- MOTIN, V. L. *et al.* The difference in the *lcrV* sequences between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* and its application for characterization of *Y. pseudotuberculosis* strains. **Microbial Pathogenesis**, London, v.12, p. 165-175, 1992.
- MORALLET, H. H. Le cas de la peste. In: : _____. **Annales de démographie historique**. Paris, 1989. cap. 5, p. 101-110.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987
- NORKINA, O. V. *et al.* Development of a diagnostic test for *Yersinia pestis* by the polymerase chain reaction. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 76, n. 3, p. 240-245, 1994.

OLMOS, A. *et al.* New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in single closed-tube. **Nucleic Acids Research**, London, v. 27, p. 1564-1565, 1999.

OOI, C. P. *et al.* Temperature related storage evaluation of an RT-PCR test *kit* for the detection of dengue infection in mosquitoes. **Tropical Biomedicine**, Malaysian, v. 22, p. 73-76, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Plague in the Americas. **Scientific Publication**, Geneve v. 115, p. 44-68, 1965.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Epidemiology, distribution, surveillance and control. In: _____. **Plague Manual**, Geneve, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Human plague in 2002 and 2003. **Weekly Epidemiological Research**, v. 79, p. 301-308, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Human plague in 2004 and 2005. **Weekly Epidemiological Record**. v. 81, p. 273-284, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. World Health Assembly, 58., 2007, Geneve. **Revision of the International Health Organizations**, Geneve, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Operational guidelines on plague surveillance, diagnosis, prevention and control**, New Delhi: Regional Office for South-East Asia, 2009.

PARKHIL L. J. *et al.* Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agente of plague. **Nature**, Paris, v. 413, p. 523-527, 2001.

PERRY, R. D.; FETHERSTON, J. D. *Yersinia pestis*-etiologic agent of plague. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, p. 35-66, 1997.

PESSOA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. Meios de Rugai e Lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 32, p. 97-100, 1972.

PODLECH, P. A. S. *et al.* Avaliação de diferentes crioprotetores na conservação de *Saccharomyces boulardii* por liofilização. **Simpósio Nacional de Fermentação**, 11., São Carlos, 1996. **Trabalhos apresentados**. São Carlos: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1996. v.2, p.752-755.

POLLITZER, R. History and present distribution of plague. In: Plague. **World Health Organization -Monograph series**, Geneva. v. 22, p. 11-45, 1954.

PRENTICE, M. B. *et al.* *Yersinia pestis* pFra shows biovar –specific differences and recent common ancestry with a *Salmonella enterica* serovar typhi plasmid. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 2586-2594, 2001.

QU, S. *et al.* Ambient stable quantitative PCR reagents for the detection of *Yersinia pestis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, p. 1-7, 2010.

RAMANUJAM, R. *et al.* Room-temperature-stable PCR reagents. **PCR Methods and Applications**, New York, v. 3, p. 75-76, 1993.

RAOULT, D. *et al.* Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of medieval black death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 12800-12803, 2000.

RUGAI, E.; ARAUJO, A. Meio de cultura para identificação presuntiva de bacilos intestinais gram-negativos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 28, p. 79-83, 1968.

SAMBROOK J. *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, p.720, 1989.

SEBBANE F. *et al.* Role of *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 5526-5530, 2006.

SODEINDE, A.O.; GOGUEN, J. D. Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 56,p. 2743-2748, 1988.

SONG, Y. *et al.* Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. **DNA Research**, Tokyo, v. 11, p. 179-197, 2004.

SOUZA G. T. *et al.* Development and Evaluation of single tube Nested PCR based approach (STNPCR) for the diagnosis of plague. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 603, p. 351-359, 2007.

SPRAGUE L. D. *et al.* *Yersinia similis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 952-958, 2008.

STENSETH, N. C. *et al.* Plague: Past, Present and Future. **PLOS Medicine**, San Francisco, v. 5, p. 9-13, 2008.

SULAKVELIDZE, A. *Yersinia* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, p. 497-513, 2000.

ten BOSCH, J. J.; ANGMAR-MANSSON, B. Characterization and validation of diagnosis methods. **Monographs in Oral Science**, Basel, v. 17, p. 174-189, 2000.

VERDONSCHOT, E. H. *et al.* Applicability of receiver operating characteristic (ROC) analysis on discrete caries depth ratings. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, Copenhagen, v. 21, p. 203-208, 1993.

WILDLIFE CONSERVATION SOCIETY. 'Deadly Dozen' reports diseases worsened by climate change. **ScienceDaily**, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedaily.com/releases/2008/10/081007073928.htm>>. Acesso em: 11 nov. 2009.

WOLFF, C. Single-tube nested PCR with room-temperature-stable reagents. **PCR Methods and Applications**, New York, v. 4, p. 376-379, 1995.

YLITALO, N. *et al.* Detection of genital human papillomavirus by single-tube nested PCR and type-specific oligonucleotide hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 1822-1828, 1995.

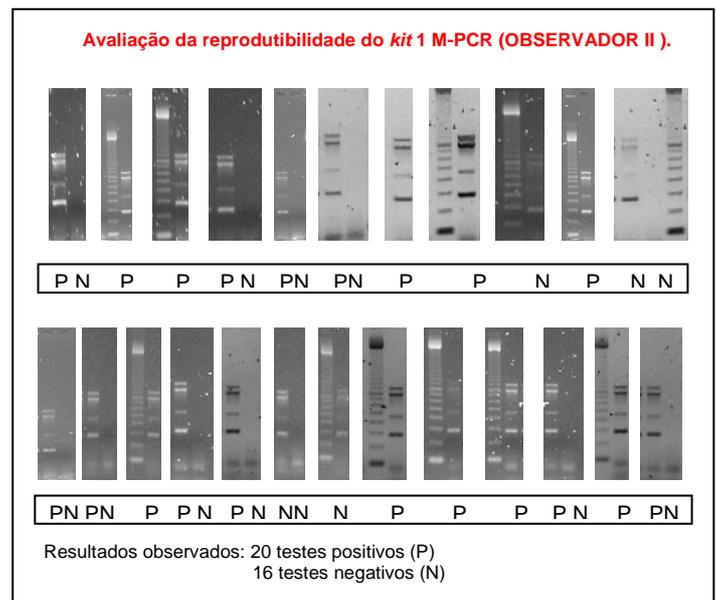
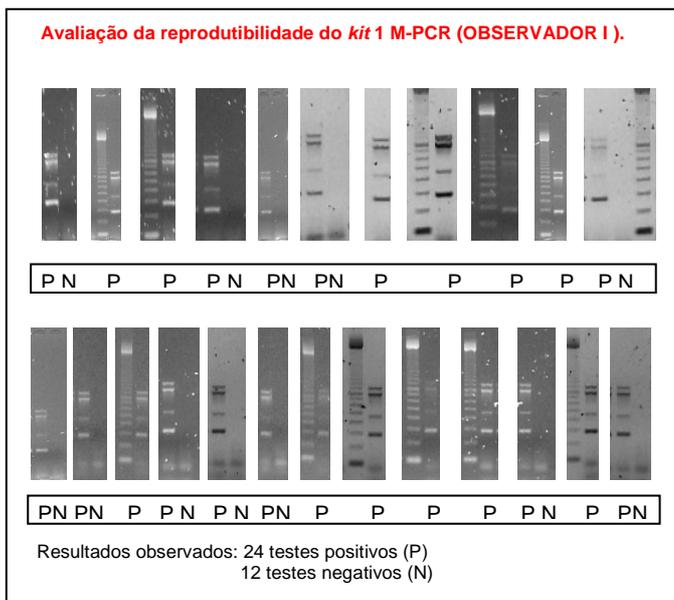
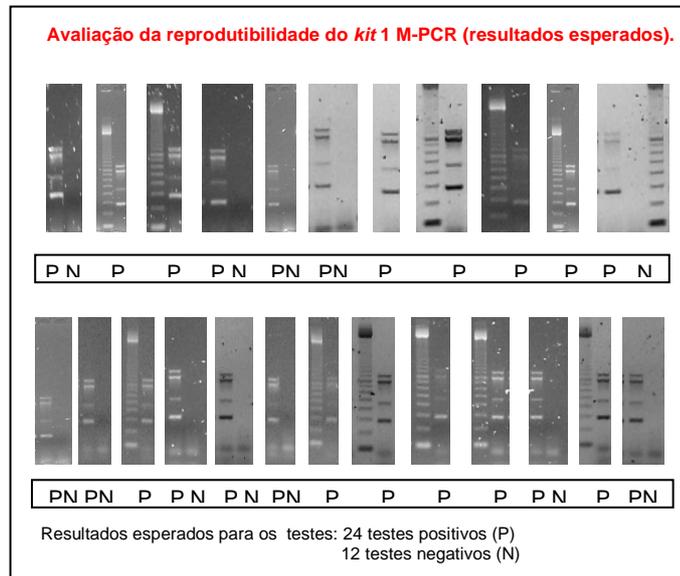
ZAVIALOV A. V. *et al.* Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation. **Cell**, Cambridge, v. 113, p. 587-596, 2003.

ZHOU, D. *et al.* Comparative and evolutionary genomics of *Yersinia pestis*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 6, p. 1226-1234, 2004.

ZUREK L. *et al.* Vector competence of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) for *Yersinia pseudotuberculosis*. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 38, p. 333-335, 2001.

APÊNDICE A

Cálculo do Índice Kappa de Cohen: *kit 1* M-PCR



		Observador I					
		POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL	
Observador II	POSITIVO	20	a	0	b	20	a + b
	NEGATIVO	4	c	12	d	16	c + d
	TOTAL	24	a + c	12	b + d	36	N

$$Po = a + d / N = 20 + 12 / 36 = 0,89$$

$$Pe = [(a + b) (a + c)] + [(c + d) (b + d)] / N^2 =$$

$$Pe = [(20+0) (20+4)] + [(4+12) (0+12)] / 36^2 = 0,52$$

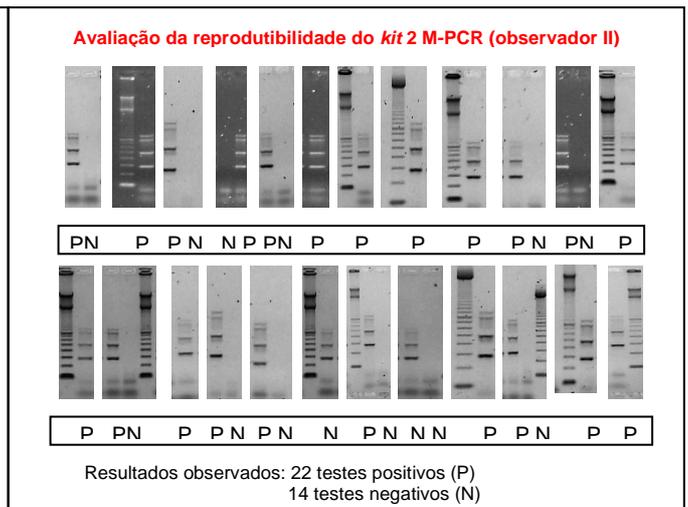
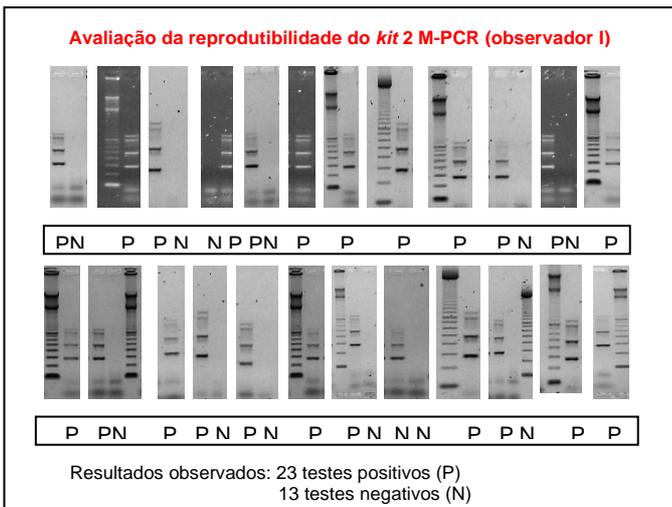
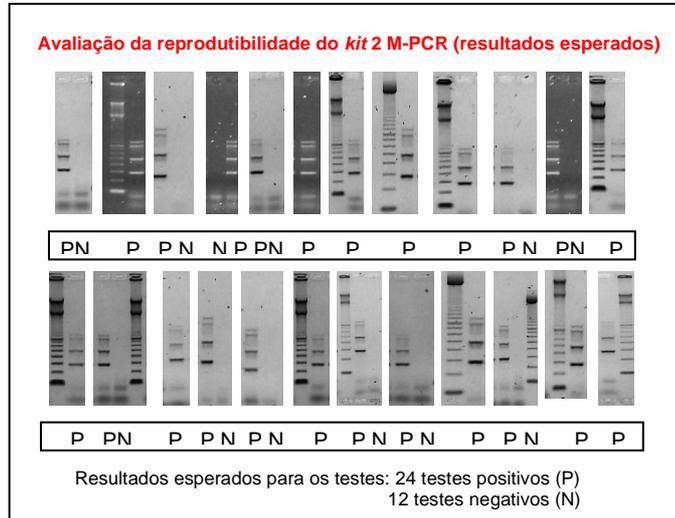
$$K = Po - Pe / 1 - Pe =$$

$$K = 0,89 - 0,52 / 1 - 0,52 = 0,77$$

Reprodutibilidade substancial

APÊNDICE B

Cálculo do Índice de Kappa de Cohen: *kit 2 M-PCR*



		Observado I					
		POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL	
Observado II	POSITIVO	22	a	0	b	22	a + b
	NEGATIVO	1	c	13	d	14	c + d
	TOTAL	23	a + c	13	b + d	36	N

$$Po = a + d / N = 22 + 13 / 36 = 0,97$$

$$Pe = [(a + b) (a + c)] + [(c + d) (b + d)] / N^2$$

$$Pe = [(22+0) (22+1)] + [(1+13) (0+13)] / 36^2 = 0,50$$

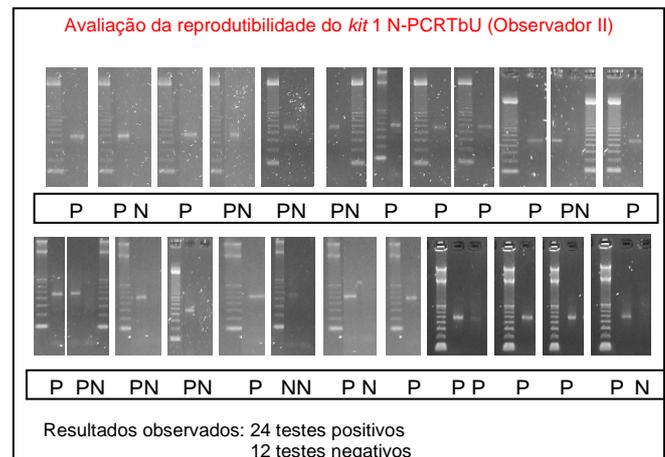
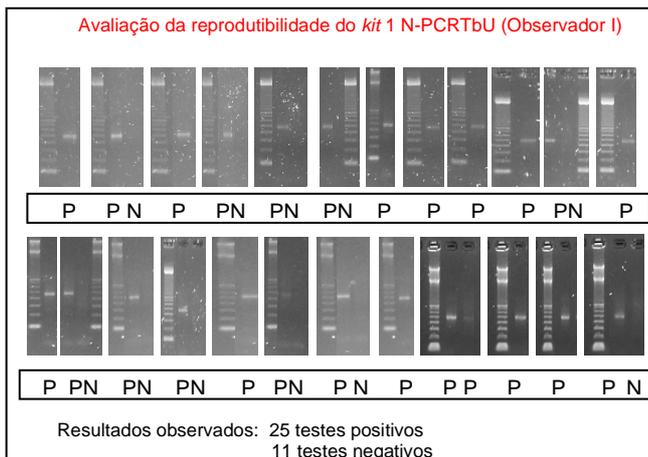
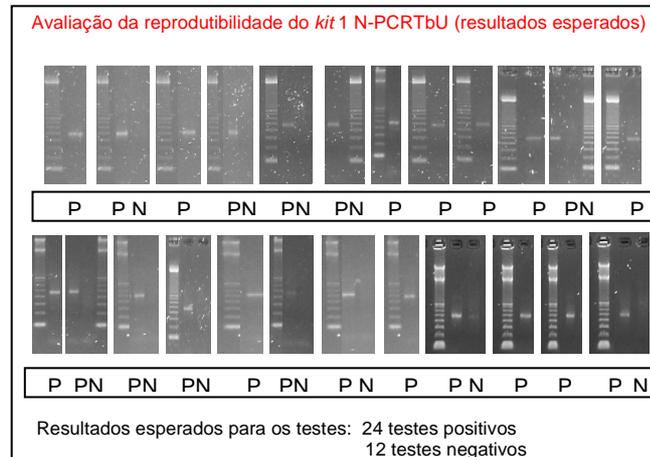
$$K = Po - Pe / 1 - Pe$$

$$K = 0,97 - 0,5 / 1 - 0,5 = 0,94$$

Reprodutibilidade quase perfeita

APÊNDICE C

Cálculo do Índice de Kappa de Cohen: *kit 1 N-PCRTbU*



		Observado I				TOTAL	
		POSITIVO		NEGATIVO			
Observado II	POSITIVO	24	a	0	b	24	a + b
	NEGATIVO	1	c	11	d	12	c + d
	TOTAL	25	a + c	11	b + d	36	N

$$Po = a + d / N = 24 + 11 / 36 = 0,97$$

$$Pe = [(a + b)(a + c)] + (c + d)(b + d) / N^2$$

$$Pe = [(24+0)(24+1)] + (1+11)(0+11) / 36^2 = 0,56$$

$$K = Po - Pe / 1 - Pe$$

$$K = 0,97 - 0,56 / 1 - 0,56 = 0,93$$

Reprodutibilidade quase perfeita

APÊNDICE D

Cálculo do Índice de Kappa de Cohen: *kit 2 N-PCRTbU*

Avaliação da reprodutibilidade do *kit 2 N-PCRTbU* (resultados esperados)

PN P P PN PN P P PN P P PN P P
PN PN PN P P N P N PN P P PN P

Resultados esperados para os testes: 24 testes positivos
12 testes negativos

Avaliação da reprodutibilidade do *kit 2 N-PCRTbU* (observador I)

PN P P PN PN P P PN P P PN P P
PN PN PN P P N P N PP P P PP P

Resultados observados: 26 testes positivos
10 testes negativos

Avaliação da reprodutibilidade do *kit 2 N-PCRTbU* (observador II)

PN P P PN PN P P PN P P PN P P
PN PN PN P P N P N PN P P PN P

Resultados observados: 24 testes positivos
12 testes negativos

		Observado I					
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL			
Observado II	POSITIVO	24	a	0	b	24	a + b
	NEGATIVO	2	c	10	d	12	c + d
	TOTAL	26	a + c	10	b + d	36	N

$$Po = a + d / N = 24 + 10 / 36 = 0,94$$

$$Pe = [(a + b) (a + c)] + [(c + d) (b + d)] / N^2$$

$$Pe = [(24+0) (24+2)] + [(2+10) (0+10)] / 36^2 = 0,57$$

$$K = Po - Pe / 1 - Pe$$

$$K = 0,94 - 0,57 / 1 - 0,57 = 0,86$$

Reprodutibilidade quase perfeita