

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Real Time-PCR e NESTED-PCR no diagnóstico da tuberculose pulmonar

FRANCIÉLI PEDROTTI ROZALES

Porto Alegre, 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Real Time -PCR e NESTED-PCR no diagnóstico da tuberculose pulmonar

Dissertação apresentada por **Francieli
Pedrotti Rozales** para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador(a): Profa. Dr. Afonso Luis Barth
Co-Orientador(a): Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki

Porto Alegre, março 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.03.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Alexandre José Macedo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Profa. Dr. Andréia Rosane de Moura Valim

Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC

Prof. Dr. Maria Lúcia Rosa Rossetti

Universidade Luterana do Brasil – ULBRA

CIP - Catalogação na Publicação

Rozales, Francieli Pedrotti
Real Time-PCR e NESTED-PCR no diagnóstico da
tuberculose pulmonar / Francieli Pedrotti Rozales. --
2013.
74 f.

Orientador: Afonso Luis Barth.
Coorientador: Alexandre Prehn Zavaski.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Real Time PCR. 2. Nested PCR. 3. Critérios
clínicos. 4. IS6110. 5. Tuberculose. I. Barth, Afonso
Luis, orient. II. Zavaski, Alexandre Prehn,
coorient. III. Título.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de doenças auto-imunes e doenças infecciosas, no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O projeto recebeu financiamento do Grupo de Pesquisa e Pós Graduação do HCPA verba Fundo de Incentivo a Pesquisa e Ensino (FIPE) nº 12007. O autor recebeu bolsa de estudo do CNPq.

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, a quem eu admiro muito, Prof. Dr. Afonso Luís Barth, pela confiança, pelas oportunidades, e, sobretudo pelo exemplo de profissionalismo acadêmico e científico, muito obrigada pela orientação.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki, pelo alto nível científico que acrescentou a esse trabalho. Obrigado por aceitar e acreditar na proposta deste estudo.

À querida Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado, sem você nada disso seria possível. Obrigada pela confiança, dedicação e carinho dedicados a mim. Obrigada pela parceria, amizade e ensinamentos compartilhados durante este período, não tenho palavras para dizer o quão importante você foi na realização desse sonho. Muito obrigada por tudo.

Às grandes amigas e colegas de laboratório, Vanessa Bley Ribeiro, Mariana Pagano e Juliana Barin, por todos os momentos de desabafo, alegrias, e, principalmente, por fazerem parte da minha vida.

Aos colegas do grupo de pesquisa, pelo companheirismo e ajuda nos momentos difíceis, em especial à Luciana Nunes e Cássia Cardoso, que se tornaram, além de colegas, grandes amigas.

Aos colegas da Microbiologia e Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio e auxílio, em especial à Katia Oliveira, pela ajuda com a seleção das amostras, e à Fernanda de Paris pela amizade e ensinamentos compartilhados durante este período.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu namorado Marlon Martins, pelo amor, carinho e por estar sempre ao meu lado, me apoiando em todos os momentos.

Aos amigos e a todos aqueles que, de certa forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada!

À minha família, muito obrigada!

RESUMO

A tuberculose (TB) é um importante problema de saúde pública, portanto, é necessário o desenvolvimento de novas ferramentas para a detecção rápida e confiável do *Mycobacterium tuberculosis*, prevenindo a transmissão da TB. O objetivo deste estudo foi avaliar dois testes moleculares para detecção de bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) diretamente de amostras clínicas. Foi realizado um estudo transversal, no qual foram selecionadas 124 amostras respiratórias. As amostras foram avaliadas por dois testes moleculares “in house” para detecção do MTBC: NESTED-PCR (NPCR) e Real Time PCR (RT-PCR) ambos com primers para o IS6110. As amostras também foram avaliadas por um teste direto (pesquisa de BAAR). Os resultados foram comparados com a cultura para *M.tuberculosis* e também com os resultados da cultura juntamente com dados clínicos. Uma amostra comercial com quantificação de DNA conhecida foi utilizada para determinação do Limite de Detecção (LOD) dos testes moleculares. O LOD foi de 1 cópia/μL para o RT-PCR e de 25 cópias/μL para o NPCR. O BAAR apresentou baixa sensibilidade - SE - (40%) e alta especificidade - SP - (94%). Ambos os ensaios moleculares, apresentaram elevada SE e SP (RT-PCR 98% e 91%, NPCR 86% e 93%, respectivamente) em relação à cultura. Quando comparamos os resultados frente a cultura juntamente com os dados clínicos, a SE e a SP foram de 90% e 97% para a RT-PCR e de 80% e 99% para a NPCR, respectivamente. Houve um pequeno decréscimo da SE dos métodos moleculares, quando comparados com a cultura mais os dados clínicos em relação à cultura isoladamente, no entanto, a SP foi consideravelmente elevada para os três métodos avaliados. Avaliamos o custo dos insumos para os ensaios moleculares: o custo do NPCR foi de \$ 17.77/teste enquanto que o custo do RT-PCR foi de \$ 15.76/teste. Em relação ao tempo de execução dos testes o RT-PCR foi mais rápido (2 horas) do que o NPCR (4 horas). Este estudo confirma que técnicas de PCRs podem ser muito úteis para o diagnóstico rápido da TB respiratória, com altas taxas de SP. Ele também pode ser muito importante para a exclusão de diagnóstico, considerando o alto VPN encontrados no nosso estudo. Os resultados demonstraram que os ensaios moleculares visando IS6110 do *M. tuberculosis* podem ajudar a melhorar o diagnóstico da TB pulmonar, com muitos potenciais efeitos positivos para a gestão clínica e de controle da doença.

Palavras-chave: Real time PCR, Nested PCR, Tuberculose, IS6110, Critérios clínicos.

ABSTRACT

Real Time -PCR and NESTED-PCR to detect *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary samples

Tuberculosis (TB) remains as an important public health problem worldwide. Therefore, the rapid detection of *M. tuberculosis* is of primary importance to effectively reduce transmission among patients. The aims of this study were to evaluate two molecular tests to detect *M. tuberculosis* complex (MTBC) directly from clinical samples. The study included 124 respiratory samples which were evaluated by two *in house* molecular assays for MTBC detection: Nested PCR (NPCR) and Real Time PCR (RT-PCR). The respiratory samples were also evaluated by the direct test (AFB assay). The results were compared with the results of culture and also compared with the culture results plus clinical data of patients. We used a commercial DNA sample with known quantification to establish the Limit of Detection (LOD). The LOD was 1 copy/ μ L for RT-PCR and 25 copies/ μ L for NPCR. The AFB assay presented low sensitivity – SE - (40%) and a high specificity - SP – (94%). Both molecular assays, RT-PCR and NPCR presented high SE and SP (RT-PCR 98% and 91%, NPCR 86% and 93%, respectively) compared to culture. When the results of the molecular tests were compared to the culture plus clinical data the SE and SP were 90,20% and 97,26% for RT-PCR and 80,39% and 98,63% for the NPCR, respectively. It was possible to observe a slight decrease of SE of the molecular methods in comparison to culture plus clinical data in relation to culture; however, the SP was increased, since many cases of TB could not be confirmed by culture. Furthermore we evaluated the cost of molecular assays: the NPCR cost was \$17.77/test while the RT-PCR cost was \$15.76/test. The RT-PCR test was faster (2 hours) than the NPCR (4 hours) to be performed. Our study confirms that PCRs may be useful for rapid diagnosis of respiratory TB, with high SP rates. It may also be very important to exclude such diagnosis, considering the high NPV found in our study. In summary, PCRs targeting IS6110 of MTB improve the accuracy of the diagnosis of pulmonary TB, with many potential positive effects for clinical management and control of the disease.

Keywords: Real time PCR, Nested PCR, Tuberculosis, IS 6110, Clinical Criteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxas de incidência de tuberculose em 2011.....	28
Figura 2 - Taxas de incidência de tuberculose no Brasil de 1990 a 2011.....	29
Figura 3 - Taxas de mortalidade de tuberculose no Brasil de 1990 a 2011.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i> ou síndrome da imunodeficiência adquirida
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INH	Isoniazida
IS	Sequencia de Inserção
LOD	<i>Limit of Detection</i>
MDR-TB	<i>Multi-drug-resistant tuberculosis</i> ou Tuberculose multi-resistente
MNT	Micobactérias Não causadoras de Tuberculose
NAATs	Testes de amplificação de ácidos nucleicos
NPCR	<i>Nested PCR</i>
ODM	Objetivos de Desenvolvimento do Milênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PB	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RMP	Rifampicina
RNA	Acido ribonucleico
RT-PCR	<i>Real Time PCR</i>
SE	Sensibilidade
SP	Especificidade
TB	Tuberculose
XDR-TB	<i>Extensively-drug-resistant tuberculosis</i> ou Tuberculose Extremamente Resistente
ZN	<i>Ziehl-Neelsen</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 Gênero <i>Mycobacterium</i>	23
3.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
3.3 Infecção e doença.....	25
3.4 Epidemiologia.....	27
3.5 Diagnóstico	30
3.6 Diagnóstico molecular	32
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	35
Evaluation of two NAATs to detect <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in respiratory tract samples.....	37
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS.....	57
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	71

1. INTRODUÇÃO

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família Mycobacteriaceae, ordem Actinomycetales. O gênero *Mycobacterium* compreende um número crescente de novas espécies e com exceção do *Mycobacterium leprae* que não cresce *in vitro*, essas espécies são divididas em dois grupos, as espécies pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e as Micobactérias Não causadoras de Tuberculose (MNT) (Euzéby, 2012; BRASIL, 2008).

O *Mycobacterium tuberculosis* é uma espécie pertencente ao CMTB e é o principal responsável por causar tuberculose (TB) em humanos. Apesar de ser uma doença que tem cura, estima-se que um terço da população esteja infectada. É a principal causa de morte por um único agente infeccioso, e 1,4 milhões de pessoas morreram dessa doença em 2011, o que a torna um grande problema de saúde pública no mundo (Lonnroth *et al.*, 2010; WHO, 2012).

A TB geralmente afeta os pulmões e é transmitida através do ar através pela expectoração, tosse e fala de indivíduos contaminados (Dunlap *et al.*, 2000). A doença ativa pode se desenvolver tanto devido a uma infecção recente, quanto devido à reativação de uma infecção latente, adquirida no passado (Sepkowitz *et al.*, 1995; Suffys *et al.*, 1997). Estima-se que apenas 10% de todas as pessoas com sistema imunológico normal que sejam infectadas venham desenvolver a doença (Koul *et al.*, 2011), e um terço da população do mundo assintomática abriga de forma latente o *M. tuberculosis* com um risco ao longo da vida de reativação da doença (Stewart *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2009).

A reativação da TB latente é dependente do estado imunológico do hospedeiro. Nos últimos anos a co-infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), levou a um aumento no número de casos, o que resultou no uso indiscriminado dos antibióticos pra tratamento da TB, com um aumento na pressão seletiva e assim levando ao surgimento de linhagens resistentes aos fármacos utilizados no tratamento (Nguyen *et al.*, 2004).

Em 1993 a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a TB como uma emergência de saúde pública mundial, e desde então visam esforços para melhorar o diagnóstico e tratamento de indivíduos infectados (WHO, 2012).

Os métodos mais comuns para diagnóstico da TB em todo o mundo são o exame direto (baciloscopia) e a cultura (considerada o “padrão ouro” para diagnóstico TB). Porém, a baciloscopia tem baixa sensibilidade (SE) e a cultura leva de 3 a 6 semanas para gerar um resultado (Steingart *et al.*, 2006).

Diagnóstico preciso e precoce da TB é um passo crítico na gestão e no controle da doença. Visto que os testes convencionais possuem várias limitações, novas tecnologias são necessárias, especialmente em contextos de saúde com alta prevalência de co-infecção HIV/TB, e prometem uma revolução no diagnóstico da TB. Ensaios como os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) surgiram como alternativas promissoras para o diagnóstico rápido e preciso da TB (CDC, 2009; Halse *et al.*, 2010).

Nos países em desenvolvimento, técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) *in house*, com base na amplificação do elemento de inserção (IS) 6110 de *M. tuberculosis*, são utilizadas pois apresentam-se como um teste sensível e específico possibilitando um diagnóstico mais rápido e preciso do que os testes usuais (exame direto e cultura). Testes rápidos auxiliam na diminuição da cadeia de transmissão da TB podendo levar, inclusive, ao controle de disseminação da doença (Greco *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo avaliar dois testes moleculares para a detecção do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* diretamente de amostras respiratórias.

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar uma reação de Real Time - PCR sistema “TaqMan” para detecção de MTBC;
- Determinar o limite de detecção das técnicas de Real Time-PCR e Nested-PCR
- Testar amostras clínicas (pulmonares) com as técnicas de Nested-PCR e RT-PCR para detecção direta de CMBT;
- Avaliar os resultados da baciloscopia (BAAR);
- Avaliar dados clínicos para definição da TB;
- Avaliar dos resultados dos NAATs em comparação com a cultura e com a cultura juntamente com dados clínicos dos pacientes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* pertencente à família *Mycobacteriaceae*, é composto por um número crescente de novas espécies. Até o momento 156 espécies e 13 subespécies são reconhecidas, distribuídas pelos diversos ambientes do mundo, causando diversas infecções em humanos (Euzéby, 2012). Essas espécies são agrupadas em complexos em função da grande similaridade genética e do fato de causarem o mesmo espectro de doenças (Brosch *et al.*, 2002), com exceção do *Mycobacterium leprae* que não é cultivável *in vitro*, são divididas em dois grupos, as espécies pertencentes ao CMTB e as MNT (Brasil, 2008).

As espécies do CMTB causam TB no homem e nos animais. Esse complexo é composto por sete espécies: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* – BCG, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii* (Brosch *et al.*, 2002; Euzéby, 2012).

As bactérias desse complexo são definidas pelas características bioquímicas, fisiológicas e pela sua taxa de crescimento lento. Também se destacam por serem geneticamente muito relacionadas, com uma alta similaridade em suas sequências de DNA (Barrera *et al.*, 2007). Estas características dificultam a sua diferenciação por métodos convencionais fisiológicos e bioquímicos. Esta relação taxonômica muito próxima é reflexo do seu alto grau de conservação evolutiva, sendo que a homologia do genoma entre as espécies do CMTB é de quase 100% (Kremer *et al.*, 1999).

Além do CMTB, têm-se as micobactérias oportunistas e as saprófitas, chamadas de MNTs, que têm sido isoladas de diversas fontes ambientais (águas, solos, poeiras e materiais vegetais) e/ou de animais; algumas espécies são encontradas na própria microbiota epidérmica e dos tratos respiratório e gástrico-intestinal dos seres humanos (Brown-Elliott & Wallace, 2002).

3.2 *Mycobacterium tuberculosis*

O *M. tuberculosis* foi descrito pela primeira vez em 1882, por Robert Koch, que o identificou como agente causador da TB. É um bacilo reto ou ligeiramente curvo, imóvel, não esporulado, não encapsulado, aeróbio estrito, que mede de 1 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura (Barrera *et al.*, 2007; Koul *et al.*, 2011).

É classificado como micobactéria não pigmentada de crescimento lento: seu tempo de geração é longo, podendo variar de 14 a 20 horas, dependendo do meio de cultura empregado para seu crescimento; dentro do macrófago, habitualmente, multiplica-se a cada 25-32 horas. Essa característica de crescimento lento tem um importante significado clínico, pois é um dos fatores que condiciona a evolução crônica da doença (Kritski *et al.*, 2005) além disso, este microrganismo possui a capacidade de entrar em períodos de latência, com uma atividade metabólica limitada, dificultando a ação dos antimicrobianos, impondo assim um regime de tratamento longo (Cool, 2003).

Além destas características, uma peculiaridade importante é o agrupamento dos bacilos em forma de ramos alongados e tortuosos, fenômeno denominado “fator corda”. Portanto, a observação de “cordas” na baciloscopia, é uma indicação de que se trata de bactéria do MTBC.

A estrutura celular dessa bactéria consiste de uma parede espessa, rica em ácidos micólicos de alto peso molecular que apresentam um alto conteúdo lipídico, característica que confere resistência a descoloração com álcool-ácido, por isso as micobactérias são também denominadas de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (Jawetz, 1995). A parede celular complexa serve de proteção contra a ação de agentes químicos, mas, é susceptível à ação de agentes físicos, como calor, luz solar e radiação ultravioleta (Brennan & Nikaido, 1995; Metchock *et al.*, 1999).

Os estudos sobre o genoma dessa bactéria, mostraram uma sequência de DNA de 4.411.532 pb, composto por, aproximadamente, 4.000 genes e um conteúdo de G+C alto, de aproximadamente 65% (Cole & Barrell, 1998; Camus *et al.*, 2002),

O genoma do *M. tuberculosis* é rico em DNA repetitivo, como as sequências de inserção (IS), sendo que mais de 56 tipos diferentes de IS foram identificadas,

sendo a IS6110, sequência da família IS3, a mais abundante e melhor caracterizada. Assim a IS6110 é bastante utilizada na tipagem molecular para estudos de epidemiologia, devido às variações no sítio de inserção e número de cópias (Van Embeden *et al.*, 1993).

3.3 Infecção e doença

O *M. tuberculosis* é o principal agente causador da TB em humanos (Cole *et al.*, 2002). Estima-se que a TB é a maior causa de morte no mundo devida a um único agente infeccioso (WHO, 2008) sendo, um importante problema de saúde pública. Em 2011 foi estimada a detecção de cerca de 9,8 milhão de novos casos de TB no mundo inteiro (Koul *et al.*, 2011).

Os sintomas gerais da TB pulmonar são: febre, sudorese, perda de apetite e tosse acompanhada de expectoração mucopurulenta. A TB afeta principalmente os pulmões, sendo transmitida pessoa-a-pessoa através da eliminação de aerossóis contaminados com o bacilo da TB, originados durante a tosse, expectoração e fala de indivíduos infectados. As gotículas são estáveis e quando eliminadas permanecem em suspensão no ar por várias horas podendo chegar aos alvéolos pulmonares, onde se multiplicam (Riley, 1957; Riley *et al.*, 1959, Dunlap *et al.*, 2000).

A facilidade com que a infecção tuberculosa se espalha e a capacidade das bactérias persistirem sob a forma de uma infecção em longo prazo assintomática, referida como a tuberculose latente, é aspecto central na biologia da doença.

Uma série de fatores, tanto ambientais quanto relacionados ao hospedeiro, pode afetar o resultado da exposição ao bacilo da TB, mas, em média, 30% de pessoas expostas ao *M. tuberculosis* serão infectados. Cada indivíduo infectado tem algum risco de desenvolver a doença ativa, porém, estima-se que apenas 10% de todas as pessoas com um sistema imunológico normal irá desenvolver a doença. (Koul *et al.*, 2011).

Um terço da população do mundo assintomática abriga uma forma latente de *M. tuberculosis* com um risco ao longo da vida de reativação da doença. A reativação da TB latente é dependente do estado imunológico do hospedeiro; indivíduos co-infectados com HIV, ou em terapia antitumoral aumentam

significativamente a incidência da doença mesmo depois de décadas de persistência subclínica (Stewart *et al.*, 2003; Barry *et al.*, 2009). Apesar dos notáveis progressos que têm sido feito no tratamento de pacientes com TB, e das melhorias nas práticas de saúde pública, a doença continua a ser um problema de saúde pública em muitas partes do mundo.

Sem tratamento, a taxa de mortalidade é alta, entre casos de TB pulmonar com baciloscopia positiva e HIV-negativos, cerca de 70% das pessoas morrem dentro de 10 anos, e em casos de cultura positiva (mas baciloscopia negativa) a taxa de mortalidade é de 20% (Leão & Portaels, 2007).

Nas últimas décadas, a infecção causada pelo HIV contribuiu para a emergência de cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos tuberculostáticos de primeira linha, como a isoniazida (INH) e a rifampicina (RMP), diminuindo as opções de tratamento, o que resultou no surgimento de uma nova epidemia: a tuberculose multi-resistente (MDR-TB) que se tornou um desafio aos programas de controle da doença em todo o mundo (Nguyen *et al.*, 2004). Em 5 de maio de 2007 o CDC comunicou os primeiros casos de cepas resistentes a todos os antibióticos usados no tratamento da tuberculose. Estas cepas foram identificadas na Itália e na Alemanha e denominadas tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB) (Migliori *et al.*, 2007).

Além das poucas alternativas de escolha para o tratamento da TB, têm-se as interações medicamentosas que impede a co-administração de algumas drogas disponíveis com outros medicamentos, como os utilizados no tratamento do HIV ou de doenças crônicas (Dunlap *et al.*, 200; Koul *et al.*, 2011).

São necessárias medidas urgentes, como testes de diagnóstico rápido e novos medicamentos para evitar a disseminação de MDR-TB/XDR-TB e para que haja possibilidade de tratamento aos infectados. Além disso, é importante uma melhor compreensão da dinâmica e etiologia da doença, visando delinear os padrões pelos quais a doença se espalha na população (Migliori *et al.*, 2007; Ross & Dwyer, 1993; Yang *et al.*, 1996).

Em 1993, a TB foi considerada uma emergência global pela OMS, e, desde então, programas de prevenção, diagnóstico e tratamento vêm sendo incentivados (Raviglione, 2003).

Em 2000 foi desenvolvido pela Organização das Nações Unidas (ONU), os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM), os quais estabeleceram metas para melhorar os maiores problemas mundiais. A tuberculose está contemplada no 6º objetivo, intitulado: “Combater a AIDS, a malária e outras doenças”.

Visando alcançar os ODM, em 2006 a OMS lançou o “Plano Global de Combate a Tuberculose - Stop TB”, onde os objetivos são diminuir pela metade as taxas de prevalência da TB em relação a 1990 até 2015, e até 2050 eliminar a doença como um problema de saúde pública, pois sem a expansão de prevenção e tratamento dessa doença, estima-se que 10 milhões de pessoas morrerão de tuberculose, uma doença curável, até 2015 (Lonnroth *et al.*, 2010; WHO, 2010; WHO, 2012).

3.4 Epidemiologia

Apesar de ser uma doença que tem cura, a TB mata 4.500 mil pessoas por ano no mundo, estima-se que 1/3 da população esteja infectada. Em 2008 a TB foi a 4ª causa de morte por doenças infecciosas e a 1ª causa de morte dos pacientes com AIDS (WHO, 2009).

Segundo dados divulgados pela OMS, em 2010 foram diagnosticados e notificados 6,2 milhões de casos de TB no mundo, sendo 5,4 milhões de casos novos, equivalentes a 65% dos casos estimados para o mesmo ano. O número de casos de TB é maior na Ásia e África. A Índia e a China representam 40% dos casos notificados (Brasil, 2012).

Em 2011, havia uma estimativa de 8,7 milhões novos casos de TB, destes 13% seriam co-infectados com HIV, e 1,4 milhão de pessoas morreriam de TB, incluindo quase um milhão de mortes entre os indivíduos HIV-negativo e 430.000 entre as pessoas HIV-positivos (WHO, 2012).

A Figura 1 apresenta as taxas de incidência de TB estimadas mundialmente em 2011.

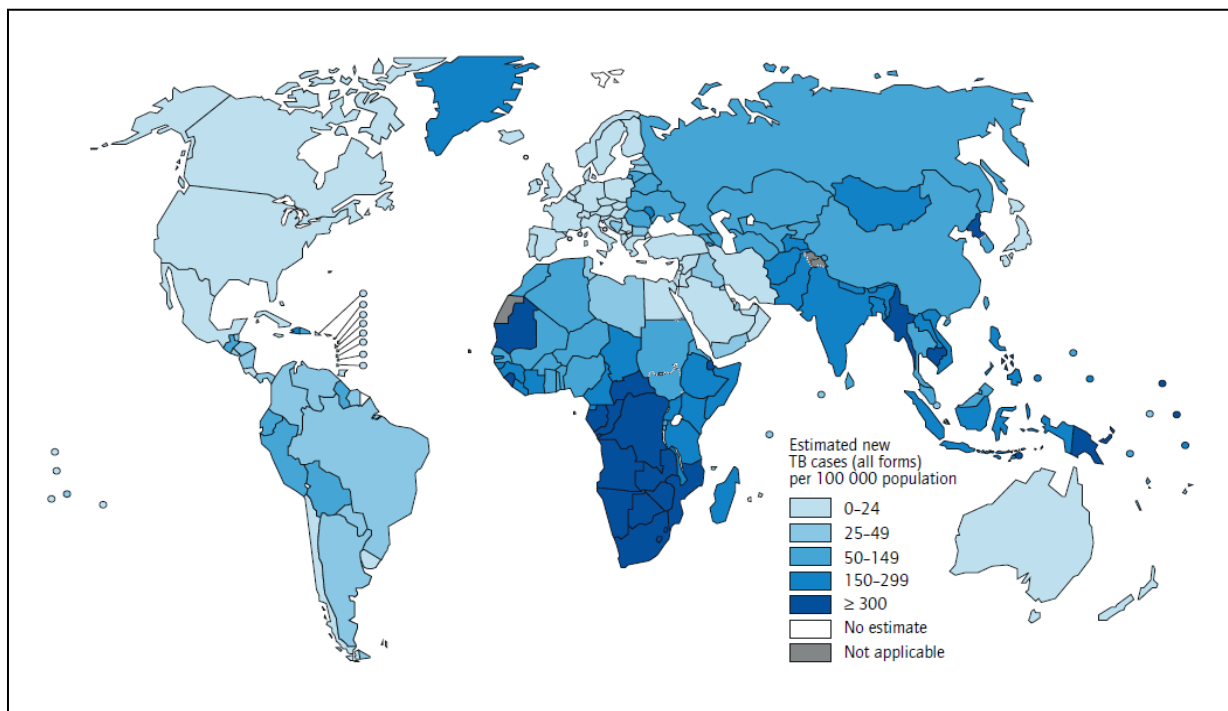


Figura 1 – Taxas de incidência de tuberculose em 2011 (WHO, 2012).

Apesar dos números ainda serem elevados, podemos observar progressos rumo às metas globais de redução em casos e mortes por TB. Entre 1995 e 2011, nos países que adotaram as estratégias da OMS, 51 milhões de pessoas foram tratadas com sucesso para a TB, poupando cerca de 20 milhões de vidas. Além disso, novos casos de TB diminuíram cerca de 2,2% entre 2010 e 2011. A taxa de mortalidade também diminuiu um decréscimo em torno de 41% desde 1990 e está a caminho de atingir a meta global de 50% redução até 2015 (WHO, 2012).

O Brasil ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 82% do total de casos de TB no mundo. A OMS considera que o Brasil detectou 88% de seus casos novos em 2010. Segundo dados do Sistema de Informação de agravos de Notificações – Ministério da Saúde (SINAN/MS), anualmente notificam-se no Brasil aproximadamente 85 mil casos de TB sendo que, destes, 71 mil são casos novos. Estima-se ainda que 4600 pessoas com tuberculose morra por ano no Brasil (Brasil, 2012).

Em 2010, entre os casos novos de TB notificados no SINAN/MS, cerca de 10% apresentavam co-infecção TB/HIV sendo que a região Sul possui o maior percentual de co-infecção. Os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul são os que apresentam as maiores taxas, e Porto Alegre é a capital com maior incidência do país. (Brasil, 2012).

Em 2010, segundo dados divulgados pela OMS, o Brasil alcançou a meta proposta pela ODM para a taxa de mortalidade por TB. As taxas de incidência e mortalidade diminuíram na última década. Em 2001, a incidência era de 42,8 casos para cada grupo de 100 mil habitantes e caiu para 36,0 no ano de 2011. A taxa de mortalidade em 2001 foi de 3,1 óbitos para cada grupo de 100 mil habitantes e foi reduzida para 2,4 em 2010, uma queda de 22,6% nos últimos 10 anos. Embora a região Sudeste concentre o maior número de casos e de óbitos por TB, a região Norte apresentou as maiores taxas de incidência, e a região Nordeste apresentou as maiores taxas de mortalidade em todos os anos analisados. (Brasil, 2012) - Figuras 2 e 3.

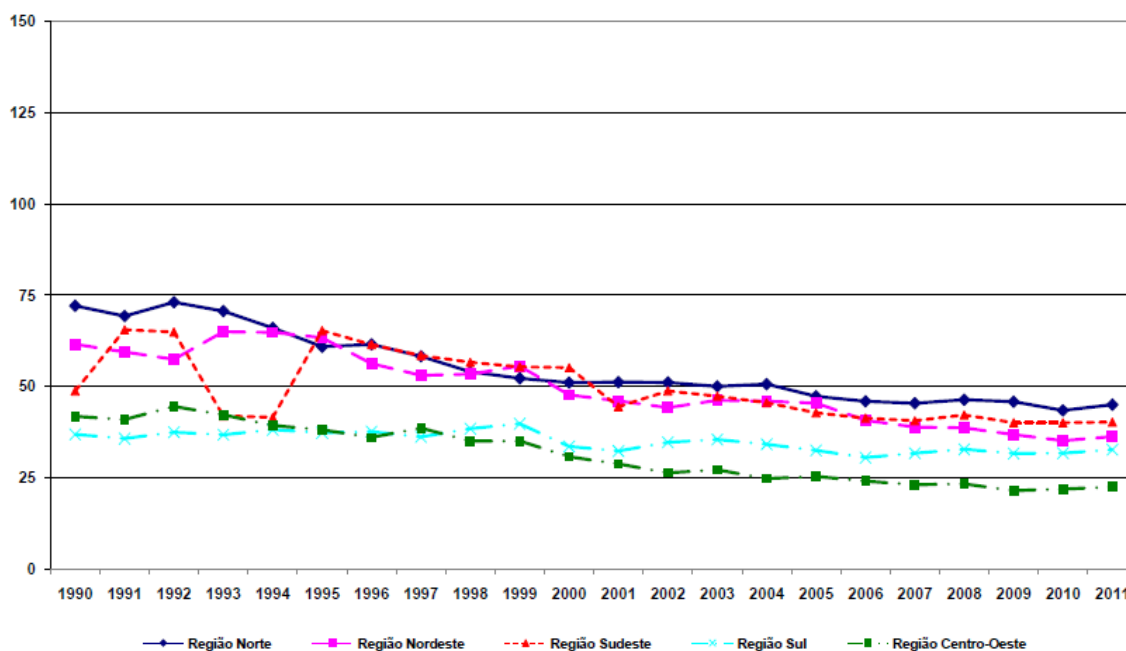


Figura 2 – Taxas de incidência de tuberculose no Brasil por região de 1990 a 2011 (Brasil, 2012) - Fonte SINAN/MS e IBGE).

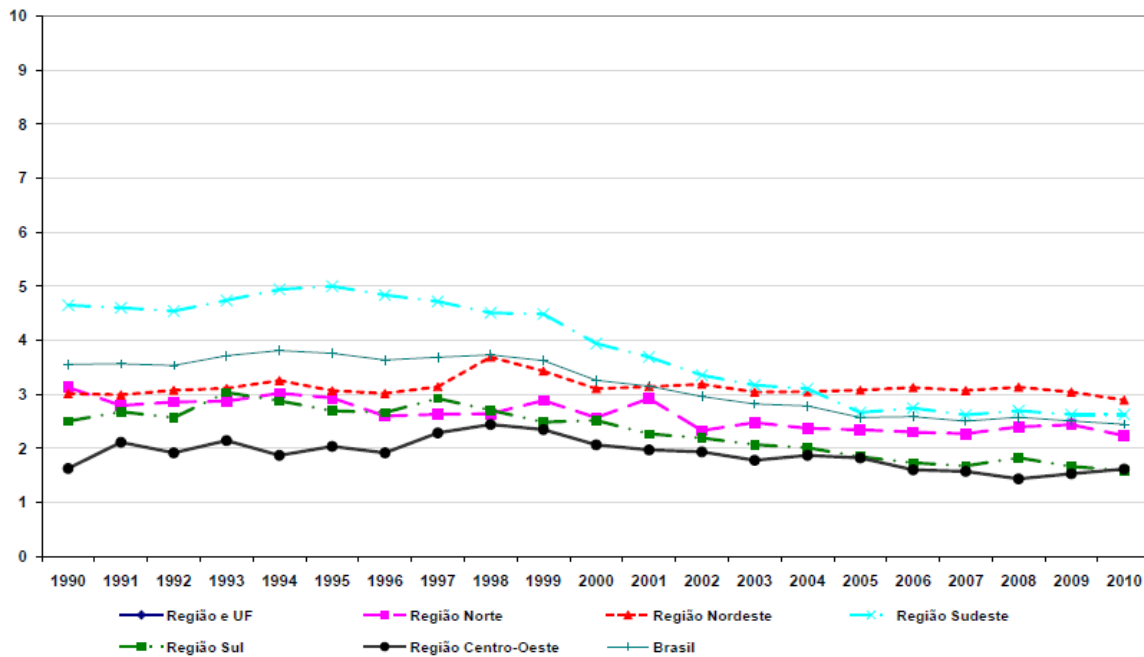


Figura 3 – Taxas de mortalidade de tuberculose no Brasil por região de 1990 a 2011 (Brasil, 2012 - Fonte Sinan/MS e IBGE).

3.5 Diagnóstico

O diagnóstico da TB na sua fase inicial é de vital importância para o início efetivo do tratamento bem como para evitar a disseminação da doença para outros pacientes. O diagnóstico clínico precoce pode ser difícil, sobretudo quando a TB ocorre associada a outras enfermidades (infecção pelo HIV, neoplasias malignas, pós-transplantes, etc), quando então o diagnóstico laboratorial é de extrema importância. Entre os métodos utilizados no diagnóstico da TB podemos citar: os métodos bacteriológicos - exame direto (baciloscopia para pesquisa de BAAR) e cultura; testes imunossorológicos; prova tuberculínica; métodos radiológicos e os métodos de biologia molecular (Steingart *et al.*, 2006).

O Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recomenda que as amostras clínicas devam ser analisadas simultaneamente por cultura, pesquisa de BAAR, e por NAATs (CDC, 2009).

A coloração para pesquisa de BAAR consiste na visualização microscópica do bacilo da TB após fixação do material clínico em lâmina e coloração com método

apropriado do material a ser analisado. O método de coloração mais utilizado é o Ziehl-Neelsen (ZN) o qual se baseia na capacidade das micobactérias em reter o corante vermelho fucsina aplicado à quente mesmo após a lâmina ser submetida a processo de descoloração com álcool/ácido. Os BAAR na coloração de ZN se apresentam como bastonetes, ligeiramente delgados, corados em vermelho com fundo azul (Bloom, 1994).

O ZN é um método rápido e com baixo custo, mas pode apresentar baixa SE, visto que são necessários no mínimo 5.000 bacilos para que o resultado seja positivo, ou seja, resultados de baciloscopia negativa não excluem a possibilidade de TB. Por outro lado a especificidade (SP) da pesquisa de BAAR na coloração de ZN também pode ser baixa, uma vez que não permite diferenciar as espécies do MTBC das MNT (Halse *et al.*, 2010; Inoue *et al.*, 2011).

O isolamento e a identificação de MTB em cultura é tradicionalmente considerado o teste “padrão-ouro” para a confirmação diagnóstica da tuberculose. Entretanto, a cultura pode não apresentar 100% de SE visto que são necessários de 10 a 1.000 bacilos viáveis por mL de amostra para obter-se uma cultura positiva. Em geral a SE da cultura é de 80-85% e a SP é aproximadamente de 98% (Dunlap *et al.*, 2000; Wallis *et al.*, 2010; WHO, 2010).

O resultado da cultura realizada em meios sólidos pode demorar de três a oito semanas e, mesmo com o uso de protocolos mais rápidos, com meios líquidos, o resultado também é demorado podendo levar mais de duas semanas. Isso se deve à característica de crescimento lento das micobactérias desse complexo (Inoue *et al.*, 2011). Além disso, a cultura é mais complexa e cara do que baciloscopia e as amostras devem ser descontaminadas antes da semeadura nos meios de cultura para evitar o crescimento de outros microrganismos de desenvolvimento mais rápido.

Embora o diagnóstico presuntivo da tuberculose possa ser feito através de dados da história clínica e achados radiológicos do paciente, o diagnóstico definitivo, como mencionado acima, ainda depende de testes laboratoriais como a cultura. Devido a isso, têm-se investido cada vez mais em testes para a detecção de micobactérias em tempo menor que o exigido para o exame cultural. Assim, as técnicas mais promissoras para o diagnóstico rápido da tuberculose são baseadas em testes moleculares, como, por exemplo, os NAATs. As técnicas de NAATs, além

de permitirem a obtenção de resultados mais rápidos que a cultura, apresentam em teoria, alta SE (podendo detectar até uma cópia de DNA de qualquer célula) e SP (Halse *et al.*, 2010; Hatta *et al.*, 2010).

As técnicas de NAATs podem ser desenvolvidas e padronizadas em laboratórios de biologia molecular conforme diferentes protocolos e assim são denominadas de técnicas “*in house*”. Existem também técnicas de NAATs de origem comerciais para o diagnóstico da TB. As técnicas comerciais são menos suscetíveis à variações inter-laboratoriais, porém, o seu emprego na rede de saúde pública brasileira é discutível, principalmente por questões de custo (Brasil, 2008).

3.6 Diagnóstico molecular

As técnicas de biologia molecular representam uma verdadeira revolução no estudo da TB, pois, auxiliam a gerar informações sobre a epidemiologia da doença, como confirmação de surtos em instituições, transmissão nosocomial, identificação de fatores de risco para transmissão, rastreamento de clones de importância em saúde pública e avaliação de contaminação cruzada em laboratórios, que através das técnicas convencionais (exame cultural e bacilosopia), seria muito difícil de serem obtidas (Sepkowitz *et al.*, 1995; Suffys *et al.*, 1997; Cohn & O'Brien, 1998, Foxman & Riley, 2001). No entanto, é no diagnóstico da TB que as técnicas de biologia molecular têm se destacado (Balasingham *et al.*, 2009).

Relatórios do CDC e da American Thoracic Society (ATS) demonstraram que os NAATs melhoram a certeza de diagnóstico, especialmente em casos de suspeita de TB cujos resultados da cultura são negativos (CDC 2000; Pai *et al.*, 2003). A fim de evitar o risco de doença progressiva, o início da terapia empírica antituberculosa tem sido sugerido para esses pacientes (Griffith *et al.*, 2007), mesmo sem um resultado de teste laboratorial que confirme a doença.

Os NAATs baseiam-se no fato das micobactérias conterem sequências específicas para gênero, espécie e cepa. Estas técnicas se baseiam na hibridização de fragmentos de ácidos nucléicos com sequências complementares de DNA ou RNA, ou através da PCR (Rossetti *et al.*, 1997).

O IS6110 e o 16S rDNA são os alvos mais comumente usados nas técnicas de NAATs para identificação de micobactérias (Thierry *et al.*, 1990; Kox *et al.*, 1995;

Springer *et al.*, 1996; Kirschner *et al.*, 1996; Garcia-Quintanilla *et al.*, 2002;. Tortoli, 2003). Outras regiões utilizadas para amplificação incluem o gene *rpoB* que codifica para a subunidade β da RNA polimerase (Adekambi *et al.*, 2003;. Kim *et al.*, 1999, Chaves *et al.*, 2000), o gene que codifica para a proteína de 32kD (Soini *et al.*, 1992;. Del Portillo *et al.*, 1996), o gene *recA* (Blackwood *et al.*, 2000), o gene *hsp65* (Ringuet *et al.*, 1999; Telenti *et al.*, 1993; Steingrube *et al.*, 1995.; Mun *et al.*, 2007), o gene *sodA* (Domenech *et al.*, 1997) e o gene 16S-23S rRNA transcrito interno espaçador (Roth *et al.*, 1998).

A IS6110 é normalmente encontrada em todas espécies de MTBC e está presente em múltiplas cópias, por esse motivo se torna um excelente alvo para a detecção do MTBC em técnicas de NAATs (Eisenach *et al.*, 1990; Patel *et al.*, 1996; Gillespie *et al.*, 1997; Caws *et al.*, 2000).

Desde os anos 90, diversos ensaios *in house* têm sido descritos para detecção do MTBC direto de amostras clínicas. Como mencionado, nas técnicas *in house* cada laboratório usa seu próprio protocolo de pré-tratamento, de extração de DNA, e detecção dos produtos de amplificação. Nos países em desenvolvimento, protocolos *in house* tem sido utilizado para amplificação do *M.tuberculosis*, pois oferecem um diagnóstico sensível, específico, rápido e com menor custo que os testes de NAATs comerciais (Sarmiento *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2005).

A necessidade de uma maior SE levou à utilização da metodologia Nested-PCR (NPCR), em que há uma amplificação inicial de uma grande região do DNA a qual é seguida por um segundo passo de amplificação, tendo como alvo uma região menor dentro do produto (*amplicon*) inicialmente gerado. Esta técnica aumenta consideravelmente a SE do teste, embora resultados falso-positivos devido à contaminação cruzada dos produtos amplificados possam ocorrer (Greco *et al.*, 2009).

Ao longo dos últimos anos, a técnica de PCR em tempo real (“Real Time-PCR” ou RT-PCR) tem sido utilizada para a detecção de micobactérias. Esta técnica, diferente das técnicas originais de PCR, permite monitoramento em tempo real de uma reação de amplificação de DNA através da medição de um sinal de fluorescência. Assim a RT-PCR é capaz de detectar uma sequência específica durante a amplificação e não necessita de tempo de processamento adicional para a detecção do produto amplificado. A RT-PCR é de fácil execução, podendo atingir

alta SE, principalmente por causa do uso de *amplicons* curtos (Van Coppenraet *et al.*, 2004). Além disso, a RT-PCR combina excelente acurácia, baixo risco de contaminação, protocolos simples e rapidez e vem sendo utilizada como uma alternativa para a PCR convencional (Espy *et al.*, 2006; Halse *et al.*, 2010). No entanto, a técnica de RT-PCR necessita de equipamentos (termocicladores) de maior custo que os equipamentos utilizados nas técnicas de PCR convencional.

Embora o uso de IS6110 como um alvo de amplificação e a utilização de metodologias como NPCR e RT-PCR tenham melhorado a SE dos testes *in house*, os testes comercialmente disponíveis têm a vantagem de serem sistemas otimizados e validados que usam protocolos simplificados e são muitas vezes totalmente automatizados. As SP dos métodos de amplificação são muito elevadas, enquanto que, as SE variam muito. Análise de mais de uma amostra de um mesmo paciente, procedimento de descontaminação adequado, melhores métodos de extração e uso de controles internos diminuem a frequência de resultados falso-negativos das técnicas de NAATs (Neonakis *et al.*, 2008). Diversos são os testes comerciais disponíveis, porém, estes sistemas têm um custo muito elevado, o que impossibilita sua implantação como teste diagnóstico de rotina, principalmente em países em desenvolvimento, onde os recursos são escassos e há um grande número de casos da doença (Wallis *et al.*, 2010).

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo submetido ao jornal *Tuberculosis*

Evaluation of two NAATs to detect *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory tract samples

Running title: PCR detection of *M. tuberculosis* in clinical samples.

Franciéli Pedrotti Rozales^{1,2}, Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado³,
Fernanda de Paris³, Alexandre P. Zavascki^{4†}, Afonso Luis Barth^{1,2,3†*}

¹ *Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil;* ² *Laboratório de Doenças Auto-Imunes e Infeciosas, Centro de Pesquisa Experimental (CPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil;* ³ *Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil;* ⁴ *Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil;*

Address of the institution at which the work was performed:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Serviço de Patologia Clínica, Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular. Rua Ramiro Barcelos, 2350. CEP 90035-903. Porto Alegre, Brasil.

* Corresponding Author: Afonso Luís Barth

Mailing address: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Patologia Clínica. 2350 Ramiro Barcelos St, 90035-903. Porto Alegre, Brasil.

Phone/fax: +55 (51) 33598315. E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

† Both senior authors contributed equally to the work.

Abstract

Tuberculosis (TB) remains as an important public health problem worldwide. Therefore, the rapid detection of *M. tuberculosis* is of primary importance to effectively reduce transmission among patients. The aims of this study were to evaluate two *in house* molecular tests: Nested PCR (NPCR) and Real Time PCR (RT-PCR) to detect *M. tuberculosis* complex directly from clinical samples. The results were compared with the culture and with the culture results plus clinical data of patients. The RT-PCR and NPCR presented high sensitivity (SE) and specificity (SP) (RT-PCR 97.62% and 91.46%, NPCR 85.71% and 92.68%, respectively) compared to culture. When the results of the molecular tests were compared to the culture plus clinical data the SE and SP were 90.20% and 97.26% for RT-PCR and 80.39% and 98.63% for the NPCR, respectively. It was possible to observe a slight decrease of SE of the molecular methods in comparison to culture plus clinical data in relation to culture; however, the SP was increased, since many cases of TB cannot be confirmed by culture. The results demonstrated that molecular assays of *M. tuberculosis* can provide a sensitive and rapid diagnostic of TB and when used in addition to the clinical data of TB-patients will help to improve the SP of the diagnosis of pulmonary TB.

Key-words: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, IS6110, PCR, detection, clinical data.

Introduction

Tuberculosis (TB) is a major infectious disease in developing countries ¹. TB remains as a considerable global public health concern as every year there are more than 9 million new cases ².

The direct and indirect costs of tuberculosis, and the social consequences, are often catastrophic for the individual patient and for the community ³. Therefore, the rapid and precise detection of *Mycobacterium tuberculosis* is of primary importance for the administration of empirical antibiotic therapy and for appropriate implementation of public health measures and effectively cut transmission and prevent the disease from spreading ⁴. In fact, an intensive effort is needed to develop new medical technologies for prevention, diagnosis, and treatment of TB ^{5,6,7}.

PCR has been an increasingly used tool for a more sensitive and rapid diagnostic of many infectious diseases, including TB. Over the years, a significant improvement of PCR technologies has been achieved with the development of real-time PCR (RT-PCR). The main advantages of RT-PCR are a shortened turnaround time; automation of the procedure, which reduces hands-on time; and a decrease in the risk of cross-contamination ⁸.

There has been a plethora of studies published over almost 20 years which have shown a considerable variation in sensitivity (SE) and specificity (SP) of the PCR when compared with culture for *M. tuberculosis* and direct detection of acid-fast bacilli (AFB) ^{9, 10}. The microbiological culture of the *M. tuberculosis* is considered the “gold-standard” for the diagnosis of TB although the negative result of the culture does not, necessarily, exclude the disease. In clinical practice, many cases of TB are diagnosed based only on clinical and radiological findings, but with no confirmation neither by direct AFB nor culture. In fact,

there are many parameters that might be evaluated to define TB ¹¹ and, therefore, it is important to consider the clinical aspects in addition to the results of laboratories assays to establish the appropriate SE and SP of a new methodology, such as PCR assays.

Reports from the US Centers for Disease Control and Prevention and the American Thoracic Society have shown that nucleic acid amplification tests (NAATs) improve diagnostic certainty, especially in TB culture-negative cases ². However, to the best of our knowledge there was no study comparing the efficacy of NAATs for *M. tuberculosis* detection in clinical samples compared with the classical “gold-standard” (culture for *M. tuberculosis*), plus clinical criteria of TB.

In this study, we assessed the performance of two NAATs, in-house nested-PCR (NPCR) and RT-PCR, for the diagnosis of pulmonary TB, considering the results of the *M. tuberculosis* culture as well as clinical criteria for the disease.

Materials and methods:

Specimens and isolates

This was a prospective study performed from February to June 2011 at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a tertiary-care teaching hospital in southern Brazil. Only one specimen per patient was selected for this study. All samples were submitted for direct detection of AFB, using the Ziehl-Neelsen stain, and culture for mycobacteria. Samples were decontaminated with *N*-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide and concentrated by centrifugation. Part of the sediment was inoculated onto an Ogawa medium (Laborclin, São José dos Pinhais, Brazil) and in a Middlebrook 7H9 broth (Difco[®] Oxford, UK). The Ogawa medium was incubated at 37°C for eight weeks and visually monitored, once a week, for

colony growth. The Middlebrook 7H9 broth was cultured in a BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System (BD Diagnostics®, USA) automated system. The sediments were also aliquoted and frozen at -20°C for subsequent PCR assays.

DNA extraction

The sediments of the clinical samples were thawed and an aliquot of 140 µL was treated with 10 µL proteinase K (Invitrogen®, Carlsbad, USA) at 56°C for 20 minutes. The DNA was extracted using a commercial extraction Kit (QiaAmp® Mini Kit 250, - Qiagen®, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Nested PCR

NPCR was used to detect *M. tuberculosis* Complex DNA, as described previously¹² with few modification. The external primers TB290 5' GGC GGG ACA ACG CCG AAT TGC GAA 3' and TB856 5' CGA GCG TAG GCG TCG GTG ACA AAG 3' were used to generate a fragment of 600 bp. Ten microliters of DNA were amplified in a 40 µL reaction mixture containing 1,25 U of Taq polymerase (Super-Therm, JMR Holdings, London, United Kingdom), 1,5 mM of MgCl₂ buffer, 2,5 mM of deoxynucleotide triphosphates (ABgene®, Epsom, UK), 25 µM of external primers (Invitrogen®, Carlsbad, USA) and distilled water, totalizing 50 µL. The mixture was submitted to a denaturation period of 100 s at 94°C, followed by 33 cycles of amplification (each cycle consisted of 94°C for 30 s, 65°C for 30 s and 72°C for 30 s). In the second reaction, the amplicon of the first DNA reaction was amplified to generate a DNA fragment of 170 bp, using the internal primers TB500 5' TAC TAC GAC CAG ATC 3' and TB607 5' TTG GTG ATC AGC CGT 3'. Two microliters of the amplicon from the first reaction were amplified in a 24 µL reaction mixture containing 1,25 U of Taq polymerase (Super-Therm, JMR Holdings, London, United Kingdom), 1,5 mM of

MgCl₂ buffer, 2,5 mM of deoxynucleoside triphosphates (ABgene[®], Epsom, UK), 25 μM of internal primers (Invitrogen[®], Carlsbad, USA) and distilled water, totalizing 26 μL. The mixture was submitted to a denaturation period of 45 s at 94°C, followed by 33 cycles of amplification (each cycle consisted of 94°C for 20 s, 52°C for 20 s and 72°C for 30 s).

We used distilled water as a negative control and the *M. tuberculosis* strain H37RV as positive control for all reactions. Visualization under ultraviolet light of the amplification products was done using 10μL of the final volume after gel electrophoresis in 2% agarose with 0.5% of ethidium bromide.

Real Time PCR

The primers and probe were selected from the gene sequence encoding the IS6110 (NCBI accession number X17348). The probe was synthesized by Applied Biosystems and labeled with 6 carboxyfluorescein (FAM) attached to the 5' end and MGB quencher linked to the 3' end, as described previously¹³.

An internal control (IC) single-strand DNA was added to detect inhibition of amplification in all samples. The primers and probe for the IC have been described previously¹³. The probe was synthesized with a VIC reporter fluorescein dye attached to the 5' end and a TAMRA quencher linked to the 3' end. Sequences of the primers, probes and IC are shown in Table 1.

The PCR mixture was performed with the Reagents DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit (Finnzymes[®], USA). Two separate reactions were prepared for amplification, one for the template and another for the IC. The reactions consisted of 7μL of target DNA, 0.3 μM of forward and reverse primers, and 0.1 μM of probe, in a final reaction volume of 25 μL. A

concentration of 1 pmol of the IC was used for the amplification procedure. The amplification was done in a ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems[®], USA) under the following conditions: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of amplification 95°C for 15 s and 64°C for 45 s. PCR was repeated on all samples containing inhibitory substances that were determined by lack of amplification of the IC. The *M. tuberculosis* H37Rv was used as a positive control in all RT-PCR assays.

Clinical Criteria

Medical records were reviewed and patients with suspected TB by the attendant physician were independently and blinded evaluated by investigators and further classified as high, undetermined or very low probability of pulmonary TB, according to the following criteria: 1) High Probability: presence of cavitary lesion and/or consolidation, or miliary infiltrate in HIV-positive patients plus treatment for TB with no other antimicrobial drug associated, or cavitary or consolidative lesion at the upper pulmonary lobes or at the upper segment of inferior lobes, or miliary lesions with no confirmed fungal infection, or any pulmonary lesion with a positive AFB examination, regardless culture results plus treatment for TB with no other antimicrobial drug associated; 2) Undetermined Probability: patients with the same radiological characteristics of “high probability” but with empirical antimicrobial treatment for other suspected infections, or patients treated for TB with no radiological pulmonary lesions; 3) Very Low Probability: patients who have not received treatment for TB regardless of the presence and characteristic of pulmonary lesions, after exclusion of the diagnosis by the attendant physician by other diagnostic methods (including diagnosis of neoplasia, other infections such as invasive mycosis, other non-*M.tuberculosis* organisms (NMT), among others).

Statistical analysis

The SE, SP, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of NAATs were calculated using two distinct 'gold-standards' for pulmonary TB: 1) culture for *M. tuberculosis* and 2) culture plus clinical criteria. A positive pulmonary TB was considered if patients had a 1) culture-positive for *M. tuberculosis* and 2) culture-positive for *M. tuberculosis* or high probability clinical criteria, respectively.

Results

Four hundred and forty-seven (447) clinical specimens were obtained from respiratory tract of patients with suspected pulmonary TB. Forty-two samples presented culture-positive for *M. tuberculosis*; 82 culture-negative samples were randomly selected among all negative samples recovered during the study period. Of the 124 samples analyzed 57 were obtained from bronchoalveolar lavage (BAL), 27 from induced sputum and 40 from expectorated sputum specimens. Forty-eight samples were recovered from HIV-positive patients.

The Limit of Detection (LOD) of the NPCR and the RTPCR assays were 25 copies/ μ L and 1 copies/ μ L, respectively.

Seventeen AFB, 36 NPCR and 41 RT-PCR assays were positive among the 42 culture positive samples and 77 AFB, 76 NPCR and 75 RT-PCR assays were negative among the 82 culture negative samples. Both NAATs presented high (> 90%) SP but the RT-PCR presented higher SE than the NPCR; PPV was also similar but the RT-PCR presented slightly higher NPV than NPCR (Table 2).

Considering the results of the NAATs versus culture plus clinical criteria, 22 AFB, 41 NPCR and 46 RT-PCR assays were positive among the 51 patients considered as positive for

pulmonary TB and 73 AFB, 72 NPCR and 71 RT-PCR assays were negative among the 73 patients considered as negative for pulmonary TB. The SP were considerably high (> 97%) for both NATTs but the SE decreased; The PPV increased considerably and the NPV slightly decreased for both NAATs (Table 3).

Six culture-negative samples were positive for *M. tuberculosis* by NPCR and seven by RT-PCR. Of these, five (the same isolates for both assays) were classified as “High Probability of TB” by clinical criteria. One sample positive by NPCR and two by RT-PCR (the same of NPCR plus another one) were classified as “Very Low Probability of TB”. There were six samples of positive culture with negative results by NPCR. One of these six culture-positive/NPCR-negative samples was also negative by RT-PCR. The accuracy of NPCR and RT-PCR were 90% and 94%, respectively.

Discussion

The rapid and precise identification of *M. tuberculosis* plays an important role in the clinical decision in the management of patients with suspected pulmonary TB. In this study we compared the results of two NAATs with mycobacterial culture as well as with cultura plus clinical data of patients with suspected TB.

As previously shown by many other studies, SE results of both NAATs evaluated in our study were significantly higher than direct detection of AFB when culture for *M. tuberculosis* solely was considered as gold-standard. Indeed, SE of commercial NAATs have ranged from 66 to 96%¹⁴ and from 84% to 97%, when “*in house*” NAATs were evaluated^{9, 13, 15, 16, 17}. When SE results were compared between both NAATs, RT-PCR presented higher SE values (97.62%) than that of NPCR (85.71%), although there was a small overlap between the 95% confidence interval (CIs) of the SE results of these tests. Despite the relatively high

SE, some samples with culture-positive results could still not be detected by NAATs. This was more notable for NPCR, which presented six false negative results, than RT-PCR which presented only one false-negative result. This different SE values obtained in NAATs can be explained by the LOD, which was higher for NPCR than for RT-PCR (25 and 1 copies/ μ L, respectively)

A slight decrease of SE of NAATs was observed in comparison with culture plus clinical criteria (80.39 and 90.20% for NPCR and RT-PCR, respectively) in relation to culture solely (85.71 and 97.62%, respectively). In fact, there were additional four samples, which were considered TB only by clinical criteria, which were negative for *M.tuberculosis* by both NAATs. One of these samples was recovered from an HIV- patient with proved pleural TB with low and medium lobes consolidations of the right lung. The other three samples were from patients with positive direct examination of AFB, but negative culture. One was an HIV patient with low and medium lobes consolidations of the right lung, the other was a non-HIV patient with a previous treated TB whom data from radiological findings could not be recovered and the third one was an non-HIV patient with previous TB and a cavitary lung lesion. In fact, in clinical practice, clinicians are recommended to treat TB when there is a positive AFB smear in the presence of clinical or radiological findings suggesting TB ^{18, 19}. One could consider that the AFB positive samples might be due to other organisms NMT.

Both NPCR and RT-PCR in our study presented high SP (>90%) rates for the diagnosis of *M. tuberculosis*, similar to SP observed in previous studies, which ranged from 85% to 98% for commercial tests, and 74 to 94 for in-house tests ^{14, 9, 13}.

As could be expected the SP value increased when NAATs were compared with the culture plus clinical data in relation to culture alone, since many cases of TB cannot be

confirmed by culture. The NPCR and the RT-PCR presented six and seven, respectively, positive results which were negative for *M. tuberculosis* in the microbiological culture. However, five of them had a “High Probability” of TB according to clinical criteria. Nevertheless, two cases were classified as “Very Low Probability” of TB, one positive by both NAATs and the other positive only by RT-PCR.

These latter occurrences could explain the reason why the SP rates were not 100% for NAATs and why SP was slightly higher for NPCR compared with RT-PCR. It should be noted that these two patients presented history of previous TB and this could account for the positivity of NAATs, since the *M. tuberculosis* DNA has also been detected in patients with previous TB with no active disease²⁰.

The SE, SP, PPV and NPV results of the NAATs were very similar after analysis according to the HIV-status of patients (data not shown). It is of note that we found seven NMT in the mycobacterial culture and these were all negative for NPCR and RT-PCR assays.

Our study confirms that NAATs may be useful for rapid and precise diagnosis of respiratory TB, with high SP rates. These molecular techniques may also be very important for excluding TB diagnosis, considering the high NPV found in our study, ranging from 87.80 to 98.68%, depending on the NAAT and the comparison considered. We did not find a significant difference in the performance of either NAATs, regardless the comparison, although RT-PCR presented SE results slightly better than NPCR, while the latter showed better results for SP. Issues such as cost of each tests in specific setting and turnaround time must be considered when choosing which test should be employed. Usually, RT-PCR has been used as an alternative to conventional PCR, since it presents elevated accuracy, short turnaround time and minimal hands-on time required for the assays^{8, 21}.

In summary, NAATs targeting the IS6110 of *M. tuberculosis* improve the accuracy of the diagnosis of pulmonary TB and may lead to potential positive effects for clinical management and control of the disease.

References

1. Maartens G, and Wilkinson RJ. **Tuberculosis.** *Lancet.* 2007;370:2030–2043.
2. Lönnroth K, Castro KG, Chakaya JM, Chauhan LS, Floyd K, Glaziou P, Raviglione MC. **Tuberculosis control and elimination 2010–50: cure, care, and social development.** *Lancet.* 2010;375:1814–29.
3. Hanson C, Floyd K, Weil D. **Tuberculosis in the poverty alleviation agenda.** In: **Raviglione M, ed. TB: a comprehensive international approach.** *New York: Informa Healthcare.* 2006;1097–114.
4. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ, Jr, Winthrop K. **ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee, American Thoracic Society, and Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007;175:367–416.
5. Abu-Raddad LJ, Sabatelli L, Achterberg JT, Sugimoto JD, Longini IM Jr, Dye C, Halloran ME. **Epidemiological benefits of more-effective tuberculosis vaccines, drugs, and diagnostics.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:13980–85

6. Ma Z, Lienhardt C, McIlleron H, Nunn AJ, Wang X. **Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality.** *Lancet.* 2010;375: 2100-09.
7. Wallis RS, Pai M, Menzies D, Doherty TM, Walzl G, Perkins MD, Zumla A. **Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice.** *Lancet.* 2010;375:1920–37.
8. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, Smith TF. **Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing.** *Clin. Microbiol. Rev.* 2006;19:165–256.
9. Greco S, Rulli M, Girardi E, Piersimoni C, Saltini C. **Diagnostic Accuracy of In-House PCR for Pulmonary Tuberculosis in Smear-Positive Patients: Meta-Analysis and Metaregression.** *J. Clin. Microbiol.* 2009;47:569–576.
10. Murray SJ, Barrett A, Magee JG, Freeman R. **Optimisation of acid fast smears for the direct detection of mycobacteria in clinical samples.** *J Clin Pathol.* 2003;56:613–615.
11. Glassroth J. **Clinical Considerations in Designing Trials of Vaccines for Tuberculosis.** *Clin Infect Dis.* 2000;30:229–32.
12. Dora JM, Geib G, Chakr R, de Paris F, Mombach AB, Lutz L, de Souza CFM, Goldani LZ. **Polymerase Chain Reaction as a Useful and Simple Tool for Rapid Diagnosis of Tuberculous Meningitis in a Brazilian Tertiary Care Hospital.** *Braz J Infect Dis.* 2008;12:245-247.

13. Inoue M, Tang WY, Wee SY, Barkham T. **Audit and improve! Evaluation of a real-time probe-based PCR assay with internal control for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30:131-5.
14. Greco S, Girardi E, Navarra A, Saltini C. **Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis.** *Thorax.* 2006;61:783–790.
15. Laraque F, Griggs A, Slopen M, Munsiff SS. **Performance of nucleic acid amplification tests for diagnosis of tuberculosis in a large urban setting.** *Clin. Infect. Dis.* 2009;49:46–54.
16. Lemaître N, Armand S, Vachée A, Capilliez O, Dumoulin C, Courcol R. **Comparison of the real-time PCR method and the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and nonpulmonary specimens.** *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:4307–4309.
17. Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, Sharp SE, Momeny MA, Babst A, Carlson JS, Kawamura M, Pandori M. **Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from respiratory specimens.** *J. Clin. Microbiol.* 2011;49:1621-3.
18. CDC. **Update: nucleic acid amplification tests for tuberculosis.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2000;49(26):593-594
19. CDC. **Treatment of Tuberculosis, American Thoracic Society, CDC, and Infectious Diseases Society of America.** *MMWR.* 2003;52(No. RR-11).

20. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, Drobniewski F, Lalvani A. **A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection.** *Health Technol Assess.* 2007;11:1–196.

21. Halse TA, Edwards J, Cunningham PL, Wolfgang WJ, Dumas NB, Escuyer VE, Musser KA. **Combined Real-Time PCR and *rpoB* Gene Pyrosequencing for Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and Determination of Rifampin Resistance Directly in Clinical Specimens.** *J. Clin. Microbiol.* 2010;48:1182–1188.

TABLE 1- Sequences of the primers, probes and internal control (IC) used in the Real Time PCR assay

Name	Sequence 5' – 3'	Fluorophore
IS6110		
TB 130 F	CAAAGCCCGCAGGACCACGA	
TB 130 R	TGCCCAGGTCGACACATAGGTGA	
TB 130 P	CCACAGCCCGTCCCGCCGAT	FAM-MGB
IC		
TBIC90 F	ATCGCTGATCCGGCCACA	
TBIC90 R	TCGGTGACAAAGGCCACGTA	
TBIC90 P	CCGCCACCCGACCTCGCAT	VIC-TAMRA
IC molecule	ATCGCTGATCCGGCCACATATCGCGTTTATGCGAGGTCGGGTG GGCGGGTCGTTAGTTTCGTTTTGGGCCTACGTGGCCTTTGTCAC CGA (90-mer)	

Table 2- Sensibility (SE), specificity (SP), Positive Predictive Value (PPV), Negative Predictive Value (NPV) and 95% confidence intervals using the NAATs and AFB versus culture.

Assay	SE	SP	PPV	NPV
AFB	40.48	93.90	77.27	75.49
	(27.04 - 55.51)	(86.51 - 97.37)	(56.56 - 89.88)	(66.32 - 82.81)
NPCR	85.71	92.68	85.70	92.68
	(72.16 - 93.28)	(84.94 - 96.60)	(72.16 - 93.28)	(84.94 - 96.60)
RT-PCR	97.62	91.46	85.42	98.68
	(87.68 - 99.58)	(83.41 - 95.80)	(72.83 - 92.75)	(92.92 - 99.77)

TABLE 3- Sensibility (SE), specificity (SP), Positive Predictive Value (PPV), Negative Predictive Value (NPV) and 95% confidence intervals using the NAATs and AFB versus culture plus clinical criteria.

ASSAY	SE	SP	PPV	NPV
AFB	43.10 (29.34 – 57.75)	100 (95.07 – 100)	100 (84.56 – 100)	71.60 (61.78 – 80.06)
NPCR	80.39 (67.54 - 88.98)	98.63 (92.64 - 99.76)	97.62 (87.68 - 99.58)	87.80 (78.99 - 93.24)
RT-PCR	90.20 (79.02 - 95.74)	97.26 (90.55 - 99.25)	95.83 (86.02 - 98.85)	93.42 (85.51 - 97.16)

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

O diagnóstico rápido e preciso da TB é essencial para tratamento adequado e evitar a transmissão da doença para outras pessoas. Neste estudo foram avaliados três métodos de diagnóstico para TB e os resultados comparados com a cultura de micobactérias, bem como com a cultura juntamente com os dados clínicos de pacientes com suspeita de tuberculose.

O teste direto BAAR apresentou baixa SE e elevada SP. As técnicas de NAATs apresentaram elevada SE e SP, que foi semelhante ou ligeiramente melhor do que a sensibilidade obtida em estudos, tanto de ensaios *in house* quanto de ensaios comerciais (Greco *et al.*, 2006, Greco *et al.*, 2009; Inoue *et al.*, 2010; Laraque *et al.*, 2009; Lemaître *et al.*, 2004; Marlowe *et al.*, 2011). Embora não estatisticamente significativo o RT-PCR tendeu a apresentar uma SE maior que o NPCR para o diagnóstico de TB, independente da comparação realizada. Apesar da elevada SE algumas amostras não puderam ser detectadas nas técnicas de NAATs. As diferenças de SE entre as técnicas moleculares analisadas poderiam ser explicadas pelos diferentes LOD nos ensaios.

Observou-se um pequeno decréscimo da SE dos NAATs quando avaliamos os resultados da cultura juntamente com os dados clínicos, visto que o diagnóstico de TB só pode ser feito, em alguns pacientes, com avaliação de critérios clínicos.

Os três ensaios avaliados tiveram uma SP elevada, acima de 90%, para o diagnóstico de MTBC. E quando avaliamos os resultados dos NAATs com cultura mais critérios clínicos observou-se um aumento da SP, uma vez que a cultura isoladamente pode não ser capaz de confirmar muitos casos de TB. Os resultados indicam que os NAATs têm um grande potencial para uso em diagnóstico, e apesar de não ter mostrado diferença estatisticamente significativa no desempenho de ambos os PCRs, o RT-PCR apresentou resultados de SE ligeiramente melhores do que o NPCR enquanto que a SP foi ligeiramente maior para o NPCR.

Na análise de custos dos NAATs o custo do NPCR foi de \$ 17.77/teste enquanto que o custo do RT-PCR foi de \$ 15.76/teste. Em relação ao tempo de execução dos testes o RT-PCR foi mais rápido (2 horas) do que o NPCR (4 horas). O RT-PCR foi cerca de \$2 mais barato que o NPCR, além disso, o tempo do ensaio RT-PCR foi aproximadamente metade do tempo exigido para a reação de NPCR.

Questões como custo de cada teste em ambiente específico e tempo de resposta devem ser consideradas na escolha do teste que deve ser empregado. A RT-PCR surgiu como uma alternativa para a PCR convencional, uma vez que apresenta elevada precisão, tempo de resposta curto e mínimo de trabalho direto necessário para os ensaios.

Este estudo confirma que NAATs (que apresentaram altas taxas de SP) são muito úteis para o diagnóstico preciso rápido da TB respiratória. Os NAATs também podem ser muito importantes para a exclusão de diagnóstico, considerando o alto VPN encontrados no nosso estudo.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEKAMBI T, COLSON P, DRANCOURT M. rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. J. Clin. Microbiol. 41,5699–5708, 2003.

BALASINGHAM SV, DAVIDSEN T, SZPINDA I, FRVE AS, TONIUM T. Molecular diagnosis in tuberculosis: Basis and implications for therapy. Molecular diagnosis and therapy. 13(3):137-151, 2009.

BARRERA L. Chapter 3: The Basics of Clinical Bacteriology. In: Palomino, J.C.; Leão, S.C.; Ritacco, V. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007. 1º Edição. TuberculosisTextbook.com. 2007.

BARRY CE, BOSHOFF HI, DARTOIS V, DICK T, EHRT S, FLYNN J, SCHNAPPINGER D, WILKINSON RJ, YOUNG D. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. Nat Rev Microbiol. 7(12):845-55, 2009.

BLACKWOOD KS, HE C, GUNTON J, TURENNE CY, WOLFE J, KABANI AM. Evaluation of recA sequences for identification of Mycobacterium species. J. Clin. Microbiol. 38:2846–2852, 2000.

BLOOM BR & FINE P. In Bloom BR, ed., 1994 , *Tuberculosis, Pathogenesis, Protection and Control*. American Society for Microbiology Washington DC. 531-553, 1994.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação nacional de Saúde. Bol. Epidemiol. 2:3, 1997.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento e Vigilância epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias. 1ª Edição Brasília, 436. 2008.

BRASIL – SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE –Boletem epidemiológico Especial Tuberculose. 2012.

BRENNAN PJ & NIKAIIDO H. The envelop of mycobacteria. Annual Review of Biochemistry. 64:29- 63, 1995.

BROSCH R, GORDON SV, MARMIESSE M, BRODIN P, BUCHRIESER C, EIGLMEIER K, GARNIER T, GUTIERREZ C, HEWINSON G, KREMER K, PARSONS LM, PYM AS, SAMPER S, VAN SOOLINGEN D, COLE ST. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proc Natl Acad Sci USA. 99(6):3684-9, 2002.

BROWN-ELLIOTT BA & WALLACE RJ. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 15(4):716-46, 2002.

CAMUS JC, PRYOR MJ, MÉDIGUE C, COLE ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiology. 148:2967-2973, 2002.

CAWS M, WILSON SM, CLOUGH C, AND DROBNIIEWSKI F. Role of IS6110-Targeted PCR, Culture, Biochemical, Clinical, and Immunological Criteria for Diagnosis of Tuberculous Meningitis. J Clin Microbiol. 38(9):3150–3155, 2000.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Nucleic acid amplification tests for tuberculosis (update). JAMA 2000.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention . Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 58:7-10, 2009.

CHAVES F, ALONSO-SANZ M, REBOLLO MJ, TERCERO JC, JIMENEZ MS, NORIEGA AR. rpoB mutations as an epidemiologic marker in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4,765–770, 2000.

COHN DL & O'BRIEN RJ. The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis for epidemiological studies of tuberculosis in developing countries. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2:16-26, 1998.

COLE ST, BROSCHE R, PARKHILL J, GARNIER T, CHURCHER C, HARRIS D, GORDON SV, EIGLMER K, GAS S, BARRY CE, TEKAIA F, BADCOCK K, BASHAM D, BROWN D, CHILLINGWORTH T, CONNOR R, DAVIES R, DEVLIN K, FELTWELL T, GENTLES S, HAMLIN N, HOLROYD S, HORNSBY T, JAGELS K, KROGH A, MCLEAN J, MOULE S, MURPHY L, OLIVER K, OSBORNE J, QUAIL MA, RAJANDREAM MA, ROGERS J, RUTTER S, SEEGER K, SKELTON J, SQUARES R, SQUARES S, SULSTON JE, TAYLOR K, WHITEHEAD S, BARRELL BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393: 537-544, 2002.

COLE ST & BARRELL BG. Analysis of the genome of mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Novartis Found Symp.* 217: 160-77, 1998.

COLL, P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 699-308, 2003.

DEL PORTILLO P, THOMAS MC, MARTINEZ E, MARANON C, VALLADARES B, PATARROYO ME, CARLOS LOPEZ M. Multiprimer PCR system for differential identification of mycobacteria in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 34,324–328, 1996.

DOMENECH P, JIMENEZ MS, MENENDEZ MC, BULL TJ, SAMPER S, MANRIQUE A, GARCIA MJ. *Mycobacterium mageritense* sp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47,535–540, 1997.

DUNLAP NE, BASS JB, FUJIWARA P, HOPEWELL PC, HORSBURGH CR. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med. 161:1376–1395, 2000.

EISENACH KD, CAVE MD, BATES JH, CRAWFORD JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. The Journal of Infection Disease. 161(5):977-981, 1990.

ESPY MJ, UHL JR, SLOAN LM, BUCKWALTER SP, JONES MF, VETTER EA, YAO JDC, WENGENACK NL, ROSENBLATT JE, COCKERILL FR, SMITH TF. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clinical Microbiology Reviews. 19(1):165–256, 2006.

EUZÉBY JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm>). Acesso em 28 novembro 2012.

FLORES LL, PAI M, COLFORD JR JM, RILEY LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. BMC Microbiology. 5:55, 2005.

FOXMAN B & RILEY L. Molecular epidemiology: focus on infection. Am. J. Epidemiol. 153:7-13, 2001.

GARCIA-QUINTANILLA A, GONZALEZ-MARTIN J, TUDO G, ESPASA M, JIMENEZ DE ANTA MT. Simultaneous identification of *Mycobacterium* genus and *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by 5'-exonuclease fluorogenic PCR. J. Clin.Microbiol. 40,4646–4651, 2002.

GILLESPIE SH, MCHUGH TD, NEWPORT LE. Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol. 35:799–801, 1997.

GRECO S, RULLI M, GIRARDI E, PIERSIMONI C, SALTINI C. Diagnostic accuracy of in-house PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: meta-analysis and metaregression. *J Clin Microbiol.* 47(3):569-76, 2009.

GRECO S, GIRARDI E, NAVARRA A, SALTINI C. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax.* 61:783–790, 2006.

GRIFFITH DE, AKSAMIT T, BROWN-ELLIOTT BA, CATANZARO A, DALEY C, GORDIN F, HOLLAND SM, HORSBURGH R, HUITT G, IADEMARCO MF, ISEMAN M, OLIVIER K, RUOSS S, VON REYN, WALLACE RJ JR, WINTHROP K. ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee, American Thoracic Society, and Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175:367–416, 2007.

HALSE TA, EDWARDS J, CUNNINGHAM PL, WOLFGANG WJ, DUMAS NB, ESCUYER VE, MUSSER KA. Combined Real-Time PCR and *rpoB* Gene Pyrosequencing for Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and Determination of Rifampin Resistance Directly in Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 48(4):1182–1188, 2010.

HATTA M, SULTAN AR, TANDIROGANG N, YADI M. Detection and identification of mycobacteria in sputum from suspected tuberculosis patients. *BMC Research Notes.* 3:72, 2010.

INOUE M, TANG WY, WEE SY, BARKHAM T. Audit and improve! Evaluation of a real-time probe-based PCR assay with internal control for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30(1):131-5, 2011.

JAWWETZ E. Medical microbiology. 20th ed. Appleton & Lange. USA. Brennan PJ and Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*, 64:29-63, 1995.

KIM BJ, LEE SH, LYU MA, KIM SJ, BAI GH, CHAE GT, KIM EC, CHA CY, KOOK YH. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). *J. Clin. Microbiol.* 37,1714–1720, 1999.

KIRSCHNER P, ROSENAU J, SPRINGER B, TESCHNER K, FELDMANN K, BOTTGER EC. Diagnosis of mycobacterial infections by nucleic acid amplification: 18-month prospective study. *J. Clin. Microbiol.* 34, 304–312, 1996.

KOUL A, ARNOULT E, LOUNIS N, GUILLEMONT J, ANDRIES K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *NATURE*. 469:483-90, 2011.

KOX LF, VAN LEEUWEN J, KNIJPER S, JANSEN HM, KOLK AH. PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3225–3233, 1995.

KREMER KD, VAN SOOLINGEN R, FROTHINGHAM WH, HAAS PW, HERMANS M, MARTÍN C, PALITTAPONGARNPIM P, PLIKAYTIS BB, RILEY LW, YAKRUS MA, MUSSER JM, VAN EMBDEN JDA. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* 37:2607-2618, 1999.

KRITSKI AL, CONDE MB, MUZY-SOUZA G. Tuberculose: do ambulatório à enfermaria. 3^a Edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

LARAQUE F, GRIGGS A, SLOPEN M, MUNSIF SS. Performance of nucleic acid amplification tests for diagnosis of tuberculosis in a large urban setting. *Clin. Infect. Dis.* 49:46–54, 2009.

LEÃO SC & PORTAELS F. Chapter 1: History. In: Palomino JC, Leão SC. Ritacco V. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007. 1^o Edição. TuberculosisTextbook.com, 2007.

LEMAITRE N, ARMAND S, VACHEE A, CAPILLIEZ O, DUMOULIN C, COURCOL RJ. Comparison of the Real-Time PCR Method and the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Pulmonary and Nonpulmonary Specimens. J. Clin. Microbiol. 42(9):4307– 4309, 2004.

LÖNNROTH K, CASTRO KG, CHAKAYA JM, CHAUHAN LS, FLOYD K, GLAZIOU P, RAVIGLIONE MC. Tuberculosis control and elimination 2010–50: cure, care, and social development. Lancet. 375:1814–29, 2010.

MARAIS BJ, RAVIGLIONE MC, DONALD PR, HARRIES AD, KRITSKI AL, GRAHAM SM, EL-SADR WM, HARRINGTON M, CHURCHYARD G, MWABA P, SANNE I, KAUFMANN SH, WHITTY CJ, ATUN R, ZUMLA A. Scale-up of services and research priorities for diagnosis, management, and control of tuberculosis: a call to action. Lancet. 375:2179–91, 2010.

MARLOWE EM, NOVAK-WEEKLEY SM, CUMPIO J, SHARP SE, MOMENY MA, BABST A, CARLSON JS, KAWAMURA M, PANDORI M. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from respiratory specimens. J. Clin. Microbiol. 49:1621-3, 2011.

METCHOCK BG, NOLTE FS, WALLACE JR RJ. Mycobacterium. In Murray, P. R. (ed) Manual of clinical microbiology. 7th Edition. ASM 1999.

MIGLIORI GB, LODDENKEMPER R, BLASI F, RAVIGLIONE MC. 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: the new XDR-TB threat. Is "science" enough to tackle the epidemic? Eur Respir J. 29:423–7, 2007.

MUN HS, KIM HJ, OH EJ, KIM H, PARK YG, BAI GH, DO J, CHA CY, KOOK YH, KIM BJ. Direct application of Avall PCR restriction fragment length polymorphism analysis (Avall PRA) targeting 644 bp heat shock protein 65 (hsp65) gene to sputum samples. *Microbiol. Immunol.* 51,105–110, 2007.

NEONAKIS IK, GITTI Z, KRAMBOVITIS E, SPANDIDOS DA. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *J Microbiol Methods.* 75:1-11, 2008.

NGUYEN LN, GILBERT GL, MARKS GB. Molecular epidemiology of tuberculosis and recent developments in understanding the epidemiology of tuberculosis. *Respirology.* 9:13-319, 2004.

PAI M, FLORES LL, PAI N, HUBBARD A, RILEY LW, COLFORD JM JR. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 3: 633-643, 2003.

PATEL S, WALL S, SAUNDERS NA. Heminested inverse PCR for IS6110 fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol.* 34:1686–90, 1996.

RAVIGLIONE MC. Tuberculosis Strategy and Operations, Stop TB Department, World Health Organization, 20 Avenue Appia, CH 1211 Geneva 27, Switzerland *Tuberculosis (Edinb)* 83:4-14, 2003.

RILEY RL. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberc.* 76(6):931-41, 1957.

RILEY RL, MILLS CC, NYKA W, WEINSTOCK N, STOREY PB, SULTAN LU, RILEY MC, WELLS WF. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis: a two-year study of contagion in tuberculosis ward. *Am J Hyg.* 70:185-96, 1959.

RINGUET H, AKOUA-KOFFI C, HONORE S, VARNEROT A, VINCENT V, BERCHE P, GAILLARD JL, PIERRE-AUDIGIER C. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 37:852–857, 1999.

ROSS BC & DWYER B. Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31:329-334, 1993.

ROSSETTI MLR, JARDIM SB, RODRIGUES VFS, MOURA AR, OLIVEIRA H, ZAHA A. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *Journal of Microbiology Methods.* 28(2):139-146, 1997.

ROTH A, FISCHER M, HAMID ME, MICHALKE S, LUDWIG W, MAUCH H. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J. Clin. Microbiol.* 36:139–147, 1998.

SARMIENTO OL, WEIGLE KA, ALEXANDER J, MILLER WC. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 41:3233–3240, 2003.

SEPKOWITZ KA, RAFFALLI J, RILEY L, KIEHN TE, ARMSTRONG D. Tuberculosis in the AIDS era. *Clin. Microbiol.* 8:180-199, 1995.

SOINI H, SKURNIK M, LIIPPO K, TALA E, VILJANEN MK. Detection and identification of mycobacteria by amplification of a segment of the gene coding for the 32-kilodalton protein. *J. Clin. Microbiol.* 30:2025–2028, 1992.

SPRINGER B, STOCKMAN L, TESCHNER K, ROBERTS GD, BOTTGER EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* 34:296-303, 1996.

STEINGART KR, NG V, HENRY M, HOPEWELL PC, RAMSAY A, CUNNINGHAM J, URBANCZIK R, PERKINGS MD, AZIZ MA, PAI M. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 6(10):664-74, 2006.

STEINGRUBE VA, GIBSON JL, BROWN BA, ZHANG Y, WILSON RW, RAJAGOPALAN M, WALLACE JR RJ. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 33, 149–153, 1995.

STEWART GR, ROBERTSON BD, YOUNG DB. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* 1:97–105, 2003.

SUFFYS PN, IVENS DE ARAÚJO ME, DEGRAVE WM. The changing face of the epidemiology of tuberculosis due to molecular strain typing – a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 92(3):297-316, 1997.

TELENTI A, MARCHESI F, BALZ M, BALLY F, BOTTGER EC, BODMER T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microb.* 31:175–178, 1993.

THIERRY D, CAVE MD, EISENACH KD, CRAWFORD JT, BATES JH, GICQUEL B, GUESDON JL. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucl. Acids Res.* 18:188, 1990.

TORTOLI E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990's. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:319-354, 2003.

VAN COPPENRAET ESB, LINDEBOOM JA, PRINS JM, PEETERS MF, CLAAS ECJ, KUIJPER EJ. Real-Time PCR Assay Using Fine-Needle Aspirates and Tissue Biopsy Specimens for Rapid Diagnosis of Mycobacterial Lymphadenitis in Children. *Journal of Clinical Microbiology.* 42(6):2644–2650, 2004.

VAN EMBDEN JD, CAVE MD, CRAWFORD JT, DALE JW, EISENACH KD, GICQUEL B, HERMANS P, MARTIN C, MCADAM R, SHINNICK TM, SMALL PM. Strain identification of *M. tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol. 31:406-409, 1993.

WALLIS RS, PAI M, MENZIES D, DOHERTY TM, WALZL G, PERKINS MD, ZUMLA A. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. Lancet Infect. Dis. 375:1920-1937, 2010.

WHO - World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. WHO report WHO/HTM/TB/2009.411). Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html. Geneva, 2009.

WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Control. Surveillance, planning, financing. WHO report 2008. "who/htm/tb/2008.393", 2008.

WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2012. (Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/).

WHO - World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO global report 2010. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.

WHO - World Health Organization. The Global Plan to Stop TB 2011–2015: Transforming the Fight Towards Elimination of Tuberculosis (World Health Organization, 2010).

YANG Z, CHAVES F, BARNES PF, BURMAN WJ, KOEHLER J, EISENACH KD, BATES JH, CAVE MD. Evaluation of method for secondary DNA typing of *Mycobacterium tuberculosis* with pTBN12 in epidemiologic study of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 34:3044-3048, 1996.

ANEXO- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 110076

Versão do Projeto:

Data da Versão: 18/04/2011

Pesquisadores:

AFONSO LUIS BARTH

FRANCIÉLI PEDROTTI ROZALEIS

Título: PCR em Tempo Real para o diagnóstico e avaliação de resistência de bactérias do Complexo Mycobacterium tuberculosis

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto deverá ser comunicada ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 13 de maio de 2011.


Prof. Nadine Clausell
Coordenadora GPRG e CEP/HCPA

