



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES



Mestrado Acadêmico em Saúde Pública

Juliana Figueirêdo da Costa Lima

Detecção do *Mycobacterium tuberculosis*
em amostras de sangue e urina através da
Nested-PCR em único tubo

RECIFE
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA FIGUEIRÊDO DA COSTA LIMA

**DETECÇÃO DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM AMOSTRAS DE
SANGUE E URINA ATRAVÉS DA NESTED-PCR EM ÚNICO TUBO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em ciências.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Haiana Charifker Schindler

Co-orientadora: Msc. Lílian Maria Lapa Montenegro

Recife

2009

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

L732d Lima, Juliana Figueirêdo da Costa.
Detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de sangue e urina através da Nested-PCR em único tubo/ Juliana Figueirêdo da Costa Lima. — Recife: J. F. C. Lima, 2009.
64 f.: il.

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

Orientadora: Haiana Charifker Schindler, co-orientadora: Lílian Maria Lapa Montenegro.

1. Tuberculose – diagnóstico. 2. Reação em Cadeia da Polimerase. 3. *Mycobacterium tuberculosis*. 4. Técnicas e Procedimentos de Laboratório. I. Schindler, Haiana Charifker. II. Montenegro, Lílian Maria Lapa. III. Título.

CDU 616-002.5

JULIANA FIGUEIRÊDO DA COSTA LIMA

DETECÇÃO DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM AMOSTRAS DE SANGUE E URINA ATRAVÉS DA NESTED-PCR EM ÚNICO TUBO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em ciências.

Aprovado em: 25/05/2009.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Haiana Charifker Schindler (Orientadora)
CPqAM/FIOCRUZ

Prof. Dr^o. Rafael Silva Duarte (Examinador Titular)
UFRJ

Dr^a. Nilma Cintra Leal (Examinadora Titular)
CPqAM/FIOCRUZ

Dr^a. Valéria R. A. Pereira (Examinadora Suplente)
CPqAM/FIOCRUZ

Dr^o. Carlos Gustavo Régis da Silva (Examinador Suplente)
CPqAM/FIOCRUZ

Dedico este trabalho, fruto de muito esforço, dedicação e apoio, primeiramente aos meus pais pelo amor, incentivo, e compreensão incondicional; aos meus irmãos pela paciência e ajuda em momentos de angústias; aos meus quatro avós por serem exemplos de vida, de trabalho e de superação e à equipe das “Tuberculetes” que sem a união delas, este trabalho não se realizaria.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé e esperança em seguir sempre buscando meus objetivos.

À minha mãe, Dulce, por me incentivar, por me apoiar, por se dedicar tanto às minhas lutas, pelo amor e dedicação em estar ao meu lado sempre e ajudar para que me torne cada dia uma pessoa melhor, profissional e pessoalmente.

Ao meu pai, Edgar, pelo apoio inquestionável nas minhas ambições profissionais, pelo orgulho que detém por mim, pela vontade sempre existente em me ajudar, pelo amor, carinho e paciência.

Aos meus irmãos, Renata e Eduardo, por me ajudarem em muitos momentos de limitações minhas, principalmente relativos ao computador; pela paciência e tolerância e pela força, direta ou indiretamente que me deram.

Aos meus avós Edgar e Denise, que sempre demonstraram admiração pelo meu trabalho, pelos incentivos e elogios.

Aos meus avós Henrique e Regina, que tanto contribuíram para a minha formação, desde pequenos elogios até grandes momentos de sabedoria e reconhecimento.

A Haiana, orientadora e amiga, que desde o início da minha vida acadêmica, ainda como estudante, foi responsável por me proporcionar grandes oportunidades e investiu em mim acreditando no meu potencial. Uma pessoa inteligente, de boa visão teórica dos projetos e que me ajudou a amadurecer na ciência.

À amiga, co-orientadora e mestre de tantos ensinamentos científicos, Lílian. Por ter-me ensinado a descobrir o que é a ciência no dia-a-dia e por me proporcionar tanto amor no que faço, além de ser uma pessoa fundamental no meu crescimento científico.

A Fred Abath (*in memoriam*), por ter participado de uma maneira muito especial no início da minha vida profissional, que mesmo com uma passagem breve, deixou grandes ensinamentos para a vida inteira.

A todas as pessoas que fazem parte da maravilhosa “Equipe das Tuberculetes”, que compõem o Laboratório de Imunoepidemiologia: Andrea, Rosana, Juliana Falcão, Heidi, Laís, Márcia, Gabriela e Fabiana. Meninas, sem a união, AMIZADE e trabalho de vocês, não seria possível a conclusão desta dissertação, que vai muito além do meu mestrado, é fruto do trabalho de uma equipe muito unida e com amor pelo que faz!

Ainda à equipe das “Tuberculetes”, agradeço às nossas sessões de “terapias” semanais que extrapolam os assuntos profissionais e nos ajudam como seres humanos para melhorarmos sempre!

Aos outros membros da Equipe do Laboratório de Imunoepidemiologia que já passaram ou que estão chegando agora: Marta Maciel, Bruno César, Layse, André, Eduardo, Marina, Pedro e aos alunos de medicina que contribuíram com este trabalho.

Às amigas e “agregadas” das Tuberculetes, Neide, Kali, Bruna e Simone que indiretamente contribuem com o nosso trabalho. Em especial a Neide que me socorreu na formatação do texto e em tantas outras dicas de “como usar as ferramentas do Word, PowerPoint...” e a Simone que tanto me ajudou com os procedimentos burocráticos do CPqAM.

A Fábio Lopes por ter me ajudado com ensinamentos práticos e discussões enriquecedoras sobre a STNPCR.

Aos meus amigos que contribuíram indiretamente com este trabalho ao proporcionarem-me muitos momentos de alegria, desabafos, de crescimento, de aprendizado e de vitórias: Lu, Gabi, Cela, Tianna, Diego Bacaninha, Amanda, Chel, Lila, Thiago Holder, Fafá, Amanda Assis e Renatinha.

A Carlos Luna por esclarecimentos na análise estatística dos meus dados.

À Secretaria Acadêmica do CPqAm/FIOCRUZ, principalmente à Nilda, Luana, Dete e Ana Paula e Joselice.

Às fontes financiadoras deste grande projeto: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, ICOHRTA/NIH, PDTIS/FIOCRUZ e FACEPE.

Ao Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ por ter cedido suas instalações para o desenvolvimento deste estudo.

A todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram com a conclusão deste trabalho dando suporte técnico, profissional ou pessoal. Obrigada!

"Não tenha medo dos confrontos, até os planetas
se chocam e do caos... nascem as estrelas"
(Charles Chaplin)

RESUMO

A tuberculose é um dos grandes problemas de saúde pública mundial devido às suas altas taxas de morbi-mortalidade e índices de transmissão, apesar de existir tratamento e medidas eficazes de controle da patologia. Este controle de disseminação dá-se principalmente através do diagnóstico precoce e do tratamento adequado. Entretanto as técnicas diagnósticas utilizadas como padrão-ouro são pouco sensíveis e inespecíficas (baciloscopia) ou laboriosas para obtenção dos resultados (crescimento lento do bacilo em meio sólido para cultura, pelo menos 4 semanas). Técnicas moleculares, como a PCR, estão sendo propostas como ferramentas auxiliares na detecção do bacilo de Koch em amostras clínicas de pacientes suspeitos de terem TB. Elas geralmente apresentam maior sensibilidade e alta especificidade, além da rapidez na obtenção dos resultados (em média 48h). No presente trabalho, a técnica molecular avaliada foi a Nested-PCR em único tubo (STNPCR), que teoricamente é mais rápida do que a Nested-PCR convencional e tem menor possibilidade de contaminação. Neste estudo, a STNPCR enquadrou-se no tipo de diagnóstico rápido, sensível e específico que pode suprir as lacunas do diagnóstico convencional da TB, com a vantagem de utilizar amostras clínicas ambulatoriais (sangue urina) coletadas em qualquer faixa etária. A sensibilidade encontrada em amostras de sangue e urina de pacientes com TB pulmonar variou de 61,02 a 72,23% e em pacientes com TB extrapulmonar a variação foi de 72,72 a 82,79%. A especificidade da STNPCR também em sangue e urina variou de 90,81 a 97,3%. Concluímos que estes tipos de amostras utilizadas na STNPCR são importantes na investigação da TB, principalmente em suspeitas de TB extrapulmonar. A STNPCR pode ser usada como alternativa diagnóstica onde podem ser evitados o uso de processos invasivos e tratamentos inadequados. Com esta nova ferramenta focos endêmicos incipientes de primo-infectados e infectados recentes podem ser detectados mais rápido, ajudando no controle de transmissão da doença.

Palavras chave: Tuberculose – diagnóstico, Reação em cadeia da polimerase, *Mycobacterium tuberculosis*, Técnicas e Procedimentos de Laboratório.

ABSTRACT

Tuberculosis has been one of the most important problems of public health in the world because this presents high rates of morbidity and mortality and high rates of transmission also, even though there is treatment and effective measures to control the disease. The control of the dissemination is mainly through early diagnosis and appropriate treatment. However the diagnostic techniques used as the gold standard have low sensibility and are nonspecific (smear) or they have difficulty to obtain results (slow growth of the bacillus on solid medium for culture, at least 4 weeks). Molecular techniques such as PCR, are being proposed as auxiliary tools in the detection of bacillus of Koch in clinical specimens from patients suspected of having TB. They generally have a higher sensitivity and high specificity, in addition to the speed in obtaining results (average 48h). In this study, the molecular technique evaluated was the Single Tube Nested-PCR (STNPCR), which is theoretically faster than the conventional nested-PCR and has less possibility of cross-contamination. In this study, the STNPCR fits the kind of rapid diagnosis, sensitive and specific that can fill the gaps of conventional diagnosis of TB, with the advantage of using outpatient clinical samples (blood and urine) collected at any age. The sensitivity found in samples of blood and urine of patients with pulmonary TB ranged from 61.02 to 72.23% and in patients with extrapulmonary TB the variation was from 72.72 to 82.79%. The specificity of STNPCR also in blood and urine ranged from 90.81 to 97.3%. We conclude that these types of samples used in STNPCR are important in the investigation of TB, especially in suspected extrapulmonary TB. The STNPCR can be used as an alternative diagnosis which invasive procedures and inadequate treatment can be avoided. With this new tool developed early endemic focus of primary infection and recent infection can be detected more quickly, helping to control the transmission of the disease.

Key words: Tuberculosis - diagnosis, Polymerase chain reaction, *Mycobacterium tuberculosis*, Laboratory Techniques and Procedures.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTIMATIVA DO NÚMERO DE NOVOS CASOS DE TB, POR PAÍS, EM 2007	25
FIGURA 2: COLÔNIAS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> CRESCIDAS EM MEIO LÖWESTEIN JENSEN.....	27
FIGURA 3: FLUXOGRAMA DA COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	42
FIGURA 4: GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS EXTERNOS (TJ5/TJ3) E INTERNOS (OLI5/STAN3)	53
FIGURA 5: ESPECIFICIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS COM DNA DE VÁRIAS ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS.....	54
FIGURA 6: GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DILUÍDO EM ÁGUA	55
FIGURA 7: GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DILUÍDO EM URINA	56
FIGURA 8: GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DILUÍDO EM SANGUE TOTAL	57
FIGURA 9: <i>M. TUBERCULOSIS</i> CRESCIDAS EM MEIO LÖWENSTEIN-JENSEN ADICIONADAS À URINA DE INDIVÍDUO SADIO	58
FIGURA 10: FLUXOGRAMA DAS AMOSTRAS COLETADAS DOS 104 PACIENTES.	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS 104 PACIENTES DO ESTUDADOS (CONTINUA)	58
TABELA 1: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS 104 PACIENTES DO ESTUDADOS (CONCLUSÃO)	59
TABELA 2: DESEMPENHO DA STNPCR EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL DE PACIENTES COM SUSPEITA DE TB	60
TABELA 3: DESEMPENHO DA STNPCR EM AMOSTRAS DE LEUCÓCITOS DE PACIENTES COM SUSPEITA DE TB	61
TABELA 4: DESEMPENHO DA STNPCR EM AMOSTRAS DE PLASMA DE PACIENTES COM SUSPEITA DE TB	61
TABELA 5: DESEMPENHO DA STNPCR EM AMOSTRAS DE URINA PACIENTES COM SUSPEITA DE TB	62
TABELA 6: DESEMPENHO DA STNPCR DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA EM CADA TIPO DE AMOSTRA CLÍNICA	63
TABELA 7: DESEMPENHO DA STNPCR EM DIVERSAS AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM SUSPEITA DE TB	64
TABELA 8: DESEMPENHO DA STNPCR EM PACIENTES COM TB DE ACORDO COM A FORMA DA DOENÇA	65
TABELA 9: DESEMPENHO DA STNPCR EM PACIENTES COM TB DE ACORDO COM A FORMA DA DOENÇA	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a. C. – Antes de Cristo

ag – Atograma

BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente

BAL – Lavado brônquio-alveolar

BCG - Bacilo Calmette-Guérin

C- – Controle negativo

C+ – Controle positivo

CDC - Center of Disease Control (Centro de controle de doenças)

CEP – Comitê de ética em Pesquisa

CPqAM – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

DNA – Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)

DOTS - Directly Observed Treatment Short-Course (Tratamento diretamente supervisionado)

E – Especificidade

EDTA – ethilenodiaminatetraacetico

E_p – Especificidade em paralelo

Fe⁺⁺ - íons ferro bivalentes

fg – Fentograma

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

h – hora(s)

HBL - Hospital Barão de Lucena

HC-UFPE - Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco

HGOF - Hospital Geral Otávio de Freitas

HIV – Human immunodeficiency vírus (Síndrome da imunodeficiência humana)

IC – Intervalo de confiança

IMIP - Instituto Medicina Integral Professor Fernando Figueira

LCR – Líquido céfalo-raquidiano

M – Marcador de peso molecular

M. – *Mycobacterium*

Mg⁺⁺ - íons magnésio bivalentes

Min. – minutos

mL – Mililitro

mm – milímetros

ng – Nanograma

NPCR – Nested PCR convencional

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – pares de bases

PBS - Phosphate buffered saline (Tampão salino de fosfato)

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

pg – Picograma

pH – Potencial hidrogeniônico

pmol – Picomol

PNB - ácido para-nitrobenzóico

PNCT - Plano Nacional de Controle da Tuberculose

PPD – Purified protein derivate (Derivado Purificado da Proteína)

rpm – rotações por minuto

S – Sensibilidade

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SINAN/MS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde

S_p – Sensibilidade em paralelo

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences (Pacote de estatística para ciências sociais)

STNPCR – Single tube nested-PCR (Nested-PCR em único tubo)

SUS – Sistema Único de Saúde

TB – Tuberculose

TCH - hidrazida do ácido tiofeno

TE - Tris-EDTA; Tris (hidroximetil) ácido aminometano ethilenodiaminatetraacetico

U - Unidade

VPN - Valor preditivo negativo

VPP - Valor preditivo positivo

VSH – Velocidade de sedimentação das hemácias

X² – Teste estatístico do Qui-quadrado

° C – Grau(s) Celsius

μl – Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 HISTÓRICO.....	21
1.1.3 TUBERCULOSE E A ARTE	23
1.2 EPIDEMIOLOGIA	24
1.3 MICROBIOLOGIA	26
1.4 HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA	27
1.5 DIAGNÓSTICO	29
1.5.1 MICROBIOLÓGICO	29
1.5.2 MÉTODOS ALTERNATIVOS	30
1.5.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	31
2 JUSTIFICATIVA	34
3 PERGUNTA CONDUTORA.....	35
4 HIPÓTESE.....	36
5 OBJETIVOS	37
5.1 GERAL	37
5.2 ESPECÍFICOS	37
6 MÉTODOS.....	38
6.1 ASPECTOS GERAIS	38
6.2 CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES.....	38
6.2.2 CRITÉRIOS DE DEFINIÇÃO DE CASO DE TB (PULMONAR OU EXTRAPULMONAR) - PADRÃO OURO	39
6.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	40
6.4 CRITÉRIOS DE PERDA	40
6.5 COLETA E DESCONTAMINAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	40
6.6 ISOLAMENTO DE LEUCÓCITOS	41
6.7 FLUXOGRAMA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS	42
6.8 CULTURA DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	43
6.8.1 A PARTIR DE CEPA DE REFERÊNCIA H37RV	43
6.8.2 A PARTIR DE AMOSTRAS CLÍNICAS	43
6.9 EXTRAÇÃO DO DNA.....	44
6.9.1 CEPA DE REFERÊNCIA (H37RV) DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	44
6.9.2 EM AMOSTRAS CLÍNICAS	44
6.10 NESTED-PCR EM ÚNICO TUBO (STNPCR)	45
6.11 ELETROFORESE	46
7 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR	47
7.1 CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INTERNOS E EXTERNOS	47
7.2 ESPECIFICIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS	47
7.3 TESTE DE EFICIÊNCIA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	47

8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	49
8.1 BANCO DE DADOS E AMOSTRA	49
8.2 DEFINIÇÕES DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALORES PREDITIVOS POSITIVO E NEGATIVO DO TESTE DIAGNÓSTICO	49
8.3 ESTATÍSTICA NAS AMOSTRAS CLÍNICAS	50
9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	52
10 RESULTADOS	53
10.1 OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS	53
10.2 ESPECIFICIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS	53
10.3 CURVA DE DILUIÇÃO DE DNA GENÔMICO PURIFICADO DILUÍDO EM ÁGUA	54
10.4 CURVA DE DILUIÇÃO DE DNA GENÔMICO DILUÍDO EM URINA HUMANA	55
10.5 CURVA DE DILUIÇÃO DE DNA GENÔMICO DILUÍDO EM SANGUE TOTAL HUMANO	56
10.6 TESTE DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO - EFICIÊNCIA X PERDA DE SENSIBILIDADE	57
10.7 CASUÍSTICA.....	58
10.8 DESEMPENHO DA STNPCR EM AMOSTRAS CLÍNICAS	60
10.8.1 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE	60
10.8.1.1 Em amostras de sangue.....	60
10.8.1.2 Em amostras de urina	62
10.8.1.3 Em amostras de sangue + urina	62
10.8.1.4 Em sangue (total e separado) e urina de acordo com a faixa etária e a forma da doença.....	63
10.8.1.5 Em qualquer amostra clínica do mesmo paciente.....	64
10.8.1.6 Em qualquer amostra clínica de acordo com o tipo da doença.....	64
11 DISCUSSÃO	66
12 CONCLUSÕES.....	81
13 REFERÊNCIAS	82
APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO	92
ANEXO A – FICHA CLÍNICA-EPIDEMIOLÓGICA	105
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO GRUPO SUSPEITO.....	112
ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO GRUPO CONTROLE.....	114
ANEXO D – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CPQAM/FIOCRUZ.....	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Existem registros de esqueletos fósseis de seres humanos com lesões ósseas compatíveis com a tuberculose (TB) encontrados em várias regiões do mundo e datados de 5.000 a.C. Essa enfermidade é uma das mais antigas da humanidade. Há ainda relatos de esqueletos de 8.000 anos a.C. acometidos por esta patologia, na Alemanha^{1,2,3}. A doença também é conhecida como “Peste branca”. Hipócrates foi o primeiro a descrever a tuberculose como tísica, que em grego significa “derreter-se”, devido ao seu caráter consumptivo⁴.

Apenas em 1882, Robert Koch conseguiu isolar o agente etiológico da tuberculose, daí a homenagem ao nome do bacilo (de Koch). Entretanto, mesmo após a descoberta do agente etiológico, o controle da tuberculose ficou restrito a medidas de “tratamentos” higiênico-dietéticos, repouso em leito e isolamento dos doentes em estabelecimentos especializados, os chamados Sanatórios⁵. Normalmente esses Sanatórios eram construídos em locais isolados das cidades, geralmente em lugares altos, com “clima de montanhas”, pois se acreditava que esta condição favorecia a cura.

No ano de 1921, Albert Calmette e Camile Guérin, ambos do Instituto Pasteur, na França, desenvolveram o que seria a primeira vacina antituberculose. Eles obtiveram uma cepa atenuada do bacilo *Mycobacterium bovis* e a partir dela criaram a vacina denominada BCG (Bacilo Calmette-Guérin). Entretanto, inicialmente a vacinação foi um desastre, visto que um terço das crianças que receberam, via oral, a vacina vieram a falecer porque a cepa utilizada não estava devidamente atenuada. Somente 20 anos depois, estudos com a BCG foram retomados⁶.

Apenas a partir da década de 50, do século passado, com a introdução da isoniazida, a luta contra a tuberculose passou a contar com arsenal terapêutico poderoso para o seu controle. Assim, com medidas mais eficazes de combate, houve uma mudança radical do perfil epidemiológico da doença. Entretanto apenas o uso da isoniazida e tecnologias apropriadas não eram suficientes, era necessário um conjunto de medidas: estrutura sanitária básica; enfoque

epidemiológico; formulação e administração de um programa de controle eficaz; decisões políticas; e participação da comunidade⁵.

Em 1890, Robert Koch anunciou a descoberta de uma substância, nomeada de Tuberculina, que formava uma endureção característica à reação em pessoas infectadas com o *M. tuberculosis* ao ser inoculado intradermicamente, enquanto os saudáveis não apresentavam qualquer reação. Portanto, o teste tuberculínico tornou-se de grande importância para o diagnóstico da infecção por tuberculose⁷. Neste mesmo período, ele desenvolveu métodos de coloração para identificação do bacilo, posteriormente aperfeiçoados pelo alemão Paul Ehrlich. Esta coloração foi a base para o desenvolvimento da coloração Ziehl-Nielsen, bastante utilizada até os dias atuais como uma das formas de diagnóstico de TB⁷.

No nosso país a tuberculose surgiu por volta do descobrimento trazida pelos portugueses, missionários jesuítas e escravos africanos. Muitos índios que habitavam o Brasil morreram rapidamente por causa da doença⁸. Com a vinda da Família Real Portuguesa para o Brasil (início do século XIX), o que proporcionou grandes movimentos migratórios, houve a disseminação da doença e 1/3 dos óbitos no país foram por tuberculose, principalmente na população negra⁹. Devido ao crescimento urbano e populacional ocorridos nos séculos subsequentes, a doença foi se tornando cada vez mais difícil de ser controlada, assumindo proporções epidêmicas⁸.

Em meados do século XIX foram criadas no País as primeiras Ligas contra a Tuberculose, em hospitais filantrópicos. Assim, ao longo dos anos novas medidas foram tomadas para tentar controlar a disseminação da doença. No início do século XX, Oswaldo Cruz instituiu um plano de ação contra a TB, porém conseguiu pouco impacto. Ainda no início daquele século, foram criados os sanatórios, depois a Inspeção de Profilaxia da Tuberculose, o Serviço Nacional de Tuberculose, a Campanha Nacional de Controle da tuberculose, os quais tentavam coordenar, uniformizar e orientar nacionalmente todas as atividades de controle da doença, por volta dos anos 40. Em 1927, efetuou-se a primeira vacinação oral com BCG no país. Posteriormente, teve início o uso da estreptomicina e da hidrazida e em 1973 foi implantada a vacinação por BCG intradérmica. Assim, medidas políticas foram tomadas e implantadas com o objetivo de controlar a disseminação, diagnosticar precocemente, tratar e curar o maior número de casos. Foi quando no ano de 1998 foi proposto o Plano Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) com a introdução da estratégia DOTS (Directly Observed Treatment Short-Course) da Organização Mundial de Saúde (OMS)⁹. O fato é que, as várias políticas de saúde implantadas ao longo da

história brasileira, tiveram impactos marcantes em alguns aspectos da epidemiologia da tuberculose. Algumas com impacto negativamente marcante, porém outras atuaram de maneira muito positiva.

1.1.3 Tuberculose e a arte

A tuberculose teve um papel importante na história literária mundial. Ela influenciou artistas e escritores durante o Romantismo, como o poeta Americano Edgar Allan Poe, que frequentemente retratava seus personagens com aparência pálida e “assombrada”. No Brasil, tivemos Álvares de Azevedo referenciando a doença em suas poesias. Nessa época ela ficou conhecida como o “Mal do Século”¹⁰.

No Modernismo a tuberculose continuou a ser tema freqüente. Manuel Bandeira, tuberculoso desde os 18 anos, escreveu o famoso poema intitulado “Pneumotórax”:

Febre, hemoptise, dispnéia e suores noturnos.
A vida inteira que podia ter sido e que não foi.
Tosse, tosse, tosse.
Mandou chamar o médico:
- Diga trinta e três.
- Trinta e três... trinta e três... trinta e três...
- Respire.
- O senhor tem uma escavação no pulmão esquerdo e o pulmão direito infiltrado.
- Então, doutor, não é possível tentar o pneumotórax?
- Não. A única coisa a fazer é tocar um tango argentino.

Em “A Dama das camélias” a tuberculose foi imortalizada como a doença do amor. O tema até os dias atuais continua em foco na arte. Na famosa adaptação para o cinema de *Moulin Rouge*, a tuberculose foi um dos temas tratados em meio a um romance com final trágico por causa da doença¹⁰.

1.2 Epidemiologia

Durante muitos séculos, a TB foi considerada uma das maiores causas de morte na população. Atualmente ela continua a ser uma das maiores causas de doença e morte na população mundial, sobretudo na Ásia e África, embora seja uma doença que tenha cura. A OMS estima que 9,27 milhões de casos novos ocorreram no ano de 2007 no mundo (139 casos novos por 100.000 habitantes) e 1,32 milhão de pessoas *Human immunodeficiency virus* (HIV) negativas morreram por TB neste mesmo ano. Entre os HIV-positivos, ocorreram 456.000 mortes por TB¹¹. Trata-se da doença infecciosa com maiores taxas de mortalidade em adultos, onde a maioria dos casos ocorre na população economicamente produtiva (entre 15 e 50 anos) e é a principal causa de morte por infecção de mulheres¹².

Ainda segundo a OMS, dos 9,27 milhões de novos casos, estima-se que 4,1 milhões (61 casos por 100.000 habitantes) dos casos novos da doença foram bacilíferos. Estes números também incluem os casos de co-infecção TB-HIV. Os 5 países que lideram o “ranking” de países com maior incidência de casos são: Índia, China, Indonésia, Nigéria, e a África do Sul¹¹ (Figura 1).

No século XX a TB chegou a alcançar taxas de incidência muito baixas na maior parte do mundo, em suas primeiras oito décadas. Entretanto, a partir da década de 80, com o advento da infecção pelo vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), as taxas de incidência, e, junto com elas, as de mortalidade e morbidade, de tuberculose voltaram a crescer rapidamente. A doença que parecia estar em vias de erradicação tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. Este quadro deve-se principalmente às co-infecções com o HIV; as desigualdades sociais, sobretudo nos países em desenvolvimento, e suas implicações (condições precárias de moradia, alimentação, transporte e educação); um crescimento no número de idosos na população e aumento da expectativa de vida; ineficiência dos programas de controle da doença e os movimentos migratórios constantes^{12,13}.

O Brasil ocupa o 14º lugar no “ranking” da OMS de países com maiores números totais de casos incidentes de TB no mundo¹¹. Já segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde (SINAN/MS), em 2008 foram confirmados 53144 casos de tuberculose, o que significou um coeficiente de incidência de 43.78 casos/100.000 habitantes¹⁴. No ano de 2006 a OMS divulgou um total de 77.632 casos notificados (novos + retreinamento) no

país, equivalente a 41 casos por 100.000 habitantes, o que torna o Brasil o país com maior número absoluto de casos entre os países da América do Sul¹⁵ e dentre todos os países do mundo, ele é um dos quatro com maior número absoluto de casos de tuberculose. Ainda segundo a OMS, a prevalência da doença (todos os casos/100.000 habitantes) no país é de 76 casos e a estimativa para mortes por tuberculose por ano no Brasil é de 8,1 mortes por 100.000 habitantes¹⁴.

O Nordeste é a região com maior taxa de incidência de tuberculose, com 48.7 casos/100.000 habitantes¹⁶. No estado de Pernambuco, foram notificados 3.922 novos casos de tuberculose, em 2008, sendo aproximadamente 4% em crianças e adolescentes (de 0 a 14 anos)¹⁷. O estado foi o 5º em números de casos notificados neste ano, ficando atrás do estado do Rio de Janeiro, Bahia, Rio Grande do Sul e Minas Gerais¹⁸. Recife já foi considerada a capital brasileira com maior taxa de mortalidade específica por tuberculose com 9.62 óbitos por 100.000 habitantes em 2004¹⁹. No Brasil, as taxas de tuberculose nas regiões socioeconomicamente menos favorecidas, o Norte e o Nordeste possuem indicadores mais elevados que nas demais²⁰.

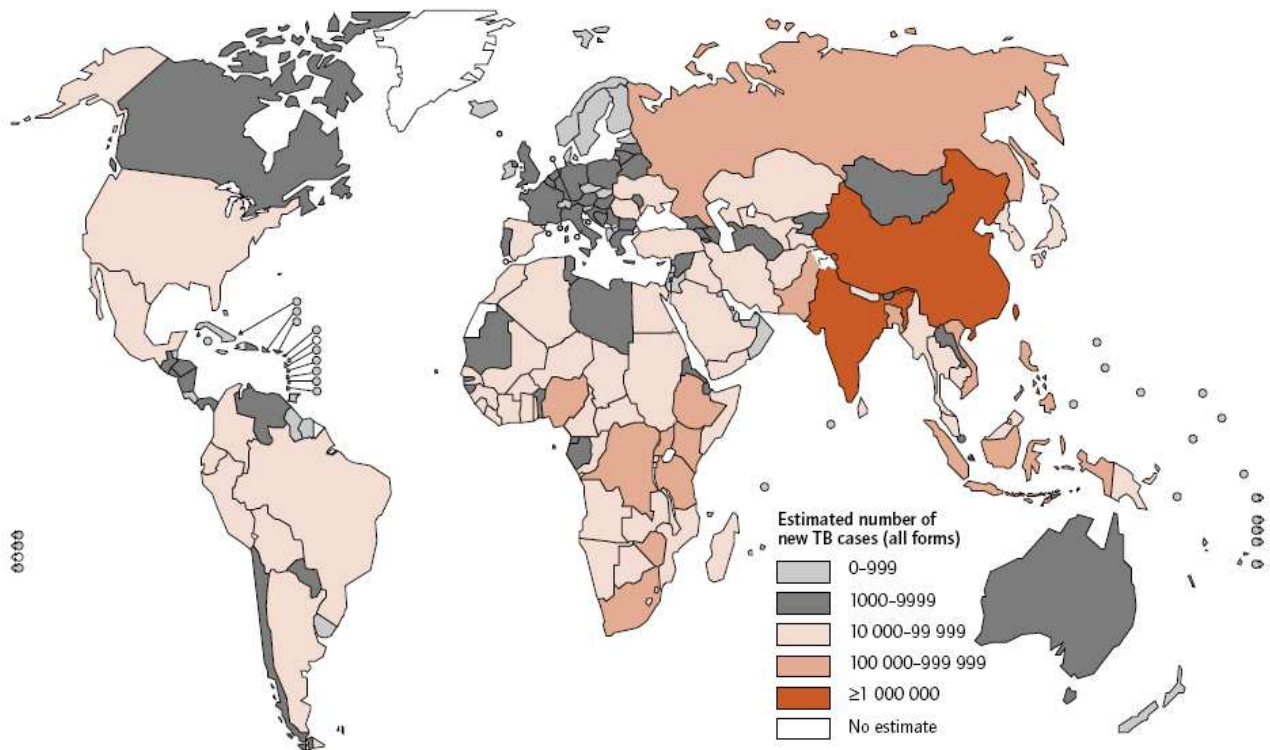


FIGURA 1: ESTIMATIVA DO NÚMERO DE NOVOS CASOS DE TB, POR PAÍS, EM 2007.
Fonte: Organização Mundial de Saúde¹⁵.

1.3 Microbiologia

A tuberculose é causada por micobactérias do gênero *Mycobacterium*, que por sua vez tem esta denominação porque ocasionalmente se observam crescimentos em forma de filamentos parecidos com fungos. Entretanto, normalmente essas bactérias são vistas ao microscópico como um bacilo típico, sob a forma de bastões. Elas são bastonetes aeróbios, não formadores de esporos²¹.

Muitas das características dessas micobactérias, como sua coloração álcool-ácido resistente, a resistência a drogas, sua patogenicidade e o longo tempo de geração, estão relacionadas à estrutura lipídica, peculiar a este gênero, de sua parede celular. Essa parede é formada, em sua porção externa, por ácidos micólicos, que forma uma camada cética, resistente à água. Devido à peculiaridade de sua parede celular, as micobactérias conseguem resistir a situações adversas como o ressecamento e algumas drogas antimicrobianas não conseguem penetrar por sua parede²¹.

Em relação a outras bactérias (gram positivas ou negativas), as micobactérias têm um crescimento mais lento. Isto se deve à dificuldade em que os nutrientes têm de atravessar sua parede celular espessa. Normalmente demoram semanas para que se consiga visualizar uma colônia crescida em meio de cultura específico para as micobactérias²¹ (Figura 2).

As micobactérias *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. caprae* e *M. pinipedii* são consideradas como espécies e subespécies do complexo *M. tuberculosis*. Estas espécies apresentam vários parâmetros semelhantes, tais como: homologia antigênica e extratos antigênicos^{22,23}.

Algumas espécies diferentes do complexo *M. tuberculosis* têm surgido como patógenos importantes (*M. smegmatis*, *M. avium*, etc.) com diferentes potenciais de produção de doença e com perfis singulares de sensibilidade e resistência a drogas antimicrobianas. O aumento de casos de tuberculose causada por micobactérias atípicas, o aparecimento de uma grande variedade de focos extrapulmonares da doença e a positividade em culturas ou baciloscopia em amostras antes consideradas improváveis, como fezes e sangue, torna necessário que se padronizem métodos de diagnóstico diferencial e que o médico clínico inclua como suspeita de diagnóstico a tuberculose na avaliação de doenças infecciosas de quadro complicado²².



FIGURA 2: COLÔNIAS DE *M. TUBERCULOSIS* CRESCIDAS EM MEIO LÖWESTEIN JENSEN.

Fonte: Fotografada pela autora.

1.4 História natural da doença

A história natural da TB desenvolve-se continuamente, no entanto, podem-se identificar três fases: exposição, infecção e doença. Existem vários fatores de risco para infecção tuberculosa e esses fatores podem variar dependendo da faixa etária do indivíduo exposto (pediátrica, adulta ou idosa). Fatores socioeconômicos, geralmente relacionados à pobreza, como desnutrição, aglomerados populacionais e a resultante possibilidade de contato próximo com caso de TB ativa são os mais conhecidos²⁴.

Os pulmões são a maior porta de entrada dos bacilos de Koch, que causam um foco de infecção no sítio onde se depositam depois da inalação. Se a infecção não conseguir ser debelada localmente, pode acontecer uma disseminação por via hematogênica dos bacilos, provavelmente no interior dos macrófagos, para outros órgãos ou para o líquido pleural. Ainda pode haver a disseminação através do sistema linfático, a partir do foco pulmonar (ducto torácico). Portanto, tanto por via hematogênica como por via linfática, focos extrapulmonares da infecção podem acontecer. As manifestações clínicas da doença dependem do local onde houve a multiplicação

dos bacilos. É importante enfatizar que a prevenção contra tuberculose através da vacinação com a BCG só é eficaz para proteger os indivíduos das formas mais graves da doença, evitando disseminação dela e as formas extrapulmonares²².

Muitos fatores contribuem para a transmissão da tuberculose: condições de saneamento populacional, viver em comunidades densamente populosas com condições de moradias precárias, condições ambientais (clima, umidade e calor), o nível de imunidade do indivíduo e da própria população, entre outros. Mesmo sendo uma doença contagiosa, não é fácil para o bacilo encontrar condições favoráveis (intrínsecas ao hospedeiro ou ao ambiente) para invadir o organismo do hospedeiro e estabelecer a doença ativa^{22,25}.

A doença pode acontecer de duas maneiras, basicamente:

a) **durante a fase inicial da infecção**: excessiva carga bacilar, alto grau de patogenicidade/virulência dos bacilos ou fatores que deprimam a imunidade do hospedeiro. Nestes casos há um desequilíbrio entre o parasita e o hospedeiro e então é estabelecida a TB primária alguns meses após a infecção²².

b) **posterior à fase inicial da infecção**: ruptura do equilíbrio hospedeiro-parasita em indivíduos com TB latente, resultando na TB pós-primária²².

A tuberculose pode ser classificada de 2 modos: TB infecção e TB doença. Sendo esta última subdividida em 2 formas clínicas: TB Pulmonar e TB Extrapulmonar. A TB infecção só tem relevância maior entre as crianças e normalmente só ocasiona febre baixa e alguns linfonodos. O desenvolvimento clínico da tuberculose só acontece em 5-10% das pessoas infectadas pelo *M. tuberculosis*, em algum momento de suas vidas. A TB pulmonar é a forma mais comum da doença pós primária. Após a penetração do bacilo pelas vias aéreas, eles podem migrar e multiplicarem-se em qualquer órgão do corpo ainda durante a infecção primária, antes de ser estabelecida uma resposta imune do hospedeiro, daí se estabelece a forma extrapulmonar da doença²².

1.5 Diagnóstico

A confirmação do diagnóstico convencional da tuberculose é dada através do exame direto em escarro, pela coloração de Ziehl-Neelsen ou pela cultura de escarro ou eventualmente de sangue e lavado gástrico (em crianças e indivíduos paucibacilares). Além da sintomatologia específica, contato com adulto bacilífero, radiografia de tórax compatível com tuberculose, hemograma com VSH alterado (velocidade de sedimentação das hemácias) e teste tuberculínico de Mantoux reator.

1.5.1 Microbiológico

No adulto com suspeita de tuberculose, a baciloscopia é largamente utilizada no diagnóstico preliminar e acompanhamento do tratamento apesar de possuir sensibilidade limitada, visto que, são necessários cerca de 10.000 organismos por mL da amostra para obtenção de resultado positivo para bacilo álcool-ácido resistente, sendo incapaz de diferenciar espécies de micobactérias, o que pode influenciar na sua especificidade^{23,26}. O isolamento e identificação do *M. tuberculosis* através da cultura é a metodologia que permite a confirmação da espécie de micobactéria, sendo por isto considerada o método padrão ouro. Apresenta uma sensibilidade maior que a baciloscopia, necessitando de cerca de 10-100 organismos por mL da amostra clínica para ser positiva. Entretanto, a cultura requer cerca de 3 a 8 semanas para obtenção do resultado, levando ao retardo do início do tratamento específico^{27,28,29}.

Na tuberculose infantil, o diagnóstico é particularmente difícil. Na literatura reconhece-se a grande dificuldade de estabelecer o diagnóstico da TB na infância devido à impossibilidade, na maioria dos casos, de comprovar-se bacteriologicamente a doença, em geral cursando com pequeno número de bacilos. Alguns autores relatam que não há método padrão ouro para o diagnóstico da TB na infância³⁰. No entanto, pode-se considerar para o diagnóstico da TB na criança um conjunto de dados indiretos (clínicos, epidemiológicos, achados radiológicos e teste tuberculínico de Mantoux) que não é perfeito na sua definição.

Devido ao aumento no número de casos de infecções causadas por micobactérias a partir da década de 1980³¹, tornou-se cada vez mais importante a realização de diagnósticos rápidos e precisos. Como o complexo *M. tuberculosis* é altamente infeccioso, torna-se de fundamental importância a precocidade do diagnóstico, tanto para o tratamento adequado do paciente, como para que se evite a disseminação da doença. Testes diagnósticos voltados para a identificação rápida, sensível e específica do agente causador da doença são elementos-chave para o sucesso de programas de saúde.

1.5.2 Métodos alternativos

Além do padrão clássico da doença (a forma pulmonar), que se desenvolve de maneira lenta, há algumas infecções por *M. tuberculosis* que fogem à este padrão. Por exemplo, um tipo de tuberculose disseminada, a miliar, que tem disseminação bastante rápida, principalmente em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência adquirida (SIDA). Daí a progressão deste tipo da doença não ser mais definida em meses ou anos, e sim em algumas semanas apenas. A multiplicação mais rápida das micobactérias tanto *M. tuberculosis* (devido a alguns pacientes serem imunossuprimidos – diabéticos, ou com co-infecções como a SIDA, crianças ou idosos) quanto as do complexo *M. avium-intracellulare* resultam em formas clínicas mais graves da doença, podendo o paciente desenvolver uma sepse e disseminação miliar. Além do fracasso em alguns tratamentos e na emergência de cepas resistentes a múltiplas drogas²³.

Novos métodos de diagnósticos vêm sendo implementados e desenvolvidos. Novas técnicas foram introduzidas na prática laboratorial nos últimos anos, tais como o uso de instrumentos automatizados e semi-automatizados, como o MGIT (BACTEC[®] 460), que tanto detecta o crescimento das micobactérias em amostras clínicas em 2 ou 3 semanas, como pode ser um método para avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos. O uso de meios de cultura líquidos (não automatizados e mais baratos que o MGIT) que também aumenta a velocidade de crescimento das micobactérias a partir das amostras biológicas. Ainda são utilizadas inoculações de amostras clínicas em meios de base Ágar (meios enriquecidos – 7H9 e 7H11, principalmente); cromatografia líquido-gasosa, cromatografia líquida de alta pressão e espectrometria de massa;

introdução de sondas de ácidos nucleicos não-isotópicas (para confirmação do cultivo do complexo *M. tuberculosis*, de *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. gordonae*; ainda existe também a aplicação da tecnologia da reação em cadeia da polimerase, a tão conhecida PCR²¹. Além de outros métodos ainda em desenvolvimento, estudo e validação, mas todos com a principal proposta de serem rápidos e com bom desempenho nas diversas amostras clínicas humanas. Os métodos alternativos citados, normalmente são utilizados por centros de referências e apenas em alguns casos específicos, não são realizados como exames de rotinas. Esses métodos citados normalmente não são utilizados na rotina para o diagnóstico da TB. Eles são métodos alternativos, mais caros que os métodos convencionais (baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen e cultura em meio sólido) e disponíveis apenas em alguns centros mais modernos ou de referência.

1.5.3 Diagnóstico molecular

Nos dias atuais as pesquisas com o *M. tuberculosis* têm avançado bastante e possibilitam o conhecimento de sua estrutura genética, o que contribui com o desenvolvimento de novos métodos moleculares para sua detecção em culturas ou diretamente de amostras biológicas³². Muitos métodos moleculares foram desenvolvidos para tentar suprir as dificuldades de detecção de alguns patógenos infecciosos pelos métodos convencionais.

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é uma técnica que permite a síntese enzimática *in vitro*, de seqüências específicas de DNA através do uso de dois iniciadores (oligonucleotídeos) que hibridizam fitas opostas de DNA. A PCR é composta de três etapas básicas: desnaturaçã, anelamento e extensão³³.

A PCR convencional simples normalmente é ineficiente na detecção de alvos moleculares raros, como ocorre em infecções com poucos organismos infecciosos (tuberculose paucibacilar, por exemplo)³⁴. Ela vem sendo proposta como método diagnóstico alternativo para várias doenças infecto-contagiosas, apresentando a vantagem de ser rápida, específica e sensível^{35,36,37,38,39}. Vários métodos baseados em PCR vêm sendo testados para a detecção do *M. tuberculosis*^{40,41,42,43}. A detecção de micobactérias em amostras clínicas de naturezas variadas

pode ser obtida em 24 horas com sensibilidade de uma cópia de DNA alvo em uma única célula bacteriana²⁷. Testes moleculares com alta sensibilidade para a detecção de *M. tuberculosis* é uma importante ferramenta para o controle e a eventual erradicação da doença no mundo⁴⁴.

A reamplificação de produtos de PCR com um segundo par de oligonucleotídeos que se ligam internamente ao local de anelamento do primeiro par, deu origem à Nested-PCR. Diversos estudos já descreveram a utilização deste tipo de PCR em duas etapas na detecção de organismos infecciosos a partir de espécimes clínicos^{39,45,46,47}.

Este método aumenta a sensibilidade da técnica⁴⁷, porém apresenta problemas de contaminação, pois os tubos precisam ser abertos para passar o produto de amplificado na 1ª reação para o microtubo onde acontecerá a 2ª reação. Portanto, os produtos amplificados na 1ª PCR passam a ser o substrato para a amplificação na 2ª PCR, com a adição de mais reagentes e neste processo pode haver troca de material amplificado de um tubo para outro (contaminação cruzada).

A Nested-PCR em único tubo ou Single tube Nested-PCR (STNPCR) é mais rápida do que as técnicas de Nested-PCR convencionais e com menor possibilidade de contaminação, pois as duas reações de PCR ocorrem seguidamente, ou seja, os produtos amplificados na primeira servem de molde para a segunda reação, sem haver abertura nem troca de tubos ou adição de novos reagentes³⁵. As maiores vantagens da STNPCR em relação à PCR convencional é a rapidez, a reprodutibilidade e um menor risco de contaminação. Portanto, a STNPCR enquadra-se num tipo de diagnóstico rápido, com possibilidade de maior sensibilidade e especificidade.

A sensibilidade da NPCR em amostras de sangue para detecção do *M. tuberculosis* teoricamente é melhor que a da STNPCR, porque esta é mais susceptível a inibidores da reação do que a Nested-PCR convencional, onde os possíveis inibidores presentes na 1ª reação vão ser mais diluídos com a adição de novos reagentes na 2ª reação de PCR^{48,49}. Por outro lado, a Nested-PCR convencional, utilizando 2 tubos, tem um risco de contaminação cruzada maior e a STNPCR minimiza esse risco de contaminação cruzada por não haver abertura dos tubos entre a 1ª e a 2ª reação⁴⁸.

O alvo escolhido para ser utilizado foi a sequência de inserção IS6110, sendo esta parte de um transposon de 1350 pb. Acreditava-se que esta sequência de inserção estava presente exclusivamente no genoma das micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*^{50,51}. Entretanto, atualmente alguns estudos já demonstram algumas micobactérias atípicas apresentam

regiões do DNA homólogas ao IS6110 presente no complexo *M. tuberculosis*^{52,53}. Apesar de em alguns estudos já se demonstrar que o IS6110 não faz parte exclusivamente do genoma do complexo *M. tuberculosis*, esta região continua sendo vastamente utilizada como marcador molecular para diagnóstico de TB. No entanto, se os experimentos com IS6110 forem realizados por pessoal devidamente qualificado num laboratório convenientemente equipado, a sensibilidade e especificidade da PCR podem ser altas⁵².

No genoma do *M. tuberculosis* são encontrados de 10 a 12 cópias dessa sequência e no *M. bovis* apenas de 1 a 3 cópias são encontradas. Um estudo de Cave e colaboradores⁵⁴ com endonucleases, mostrou que a sequência IS6110 permanece conservada através das cepas e gerações. Em outras espécies de micobactérias que não são do complexo, esta sequência não é encontrada⁵⁴.

O propósito deste trabalho é analisar a viabilidade da STNPCR como uma ferramenta que possa auxiliar no diagnóstico da TB avaliando seu desempenho em amostras clínicas de fácil coleta e disponibilidade em todos os tipos de doentes (adultos, crianças ou idosos; portadores ou não de HIV; com ou sem co-morbidades) e formas clínicas da doença (TB pulmonar ou extrapulmonar). Esperamos conseguir desenvolver um método com uma sensibilidade de detecção maior que a da cultura e especificidade em amostras de sangue e urina acima de 90%, com a vantagem de a técnica ser rápida frente aos métodos convencionais de diagnóstico, haja vista as inúmeras dificuldades encontradas no diagnóstico dessa doença, mesmo em áreas endêmicas como Pernambuco. Por outro lado, são raros os estudos no que se refere ao diagnóstico molecular da tuberculose utilizando amostras extrapulmonares principalmente em casos com baciloscopia negativa.

2 JUSTIFICATIVA

Diante das dificuldades e demora na confirmação dos resultados laboratoriais convencionais, verifica-se que há uma lacuna na obtenção de um diagnóstico eficiente da tuberculose, sobretudo nas formas paucibacilares e extrapulmonares.

Nosso propósito foi realizar um estudo com pacientes suspeitos de tuberculose (pulmonar ou extrapulmonar, estando ela ativa em ambos os casos) para os quais os exames convencionais não foram suficientes para o diagnóstico. Avaliamos uma técnica molecular baseada no sistema de PCR³⁵ em duas espécimes biológicas diferentes (sangue e urina) como método auxiliar na confirmação da doença.

Esperou-se que a análise da STNPCR como alternativa diagnóstica pudesse vir contribuir para que se evitem processos invasivos e tratamentos inadequados, e que esta nova ferramenta consiga detectar focos endêmicos incipientes de pacientes primo-infectados, com infecção latente, além dos doentes. Portanto, a possibilidade de um diagnóstico precoce e eficaz certamente irá interferir na quebra da transmissão do agente patológico e no controle da doença.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Existe um teste diagnóstico rápido e com bom desempenho que possa auxiliar a conduta clínica de pacientes com suspeita de tuberculose, sobretudo nas formas graves e paucibacilares utilizando amostras clínicas de coleta pouco invasivas e ambulatoriais?

4 HIPÓTESE

A STNPCR consiste em uma técnica rápida, reprodutível e apresenta um bom desempenho na detecção do *M. tuberculosis* em amostras de sangue e urina de pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar. Ela pode ser utilizada como um método diagnóstico auxiliar para tuberculose, sobretudo nas formas que apresentam dificuldade na detecção do bacilo através dos métodos convencionais (baciloscopia e cultura).

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Padronizar de técnica molecular baseada em PCR para a detecção rápida do *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de sangue e urina de pacientes com suspeita da doença.

5.2 Específicos

- a) Otimizar como método diagnóstico para TB a técnica de Nested-PCR em um único tubo, utilizando como alvo a seqüência de inserção IS6110.
- b) Avaliar a especificidade, sensibilidade e valores preditivos positivo e negativo da STNPCR na detecção do *M. tuberculosis* em amostras de sangue e urina de pacientes com suspeita de TB pulmonar e extrapulmonar ativa.

6 MÉTODOS

6.1 Aspectos gerais

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Imunoepidemiologia (Departamento de Imunologia) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ (CPqAM). Trata-se de um estudo prospectivo em relação ao seguimento clínico do paciente e analítico. A casuística foi composta por indivíduos de ambos os sexos, sem restrição de idade, provenientes de ambulatório e enfermaria do Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), do Hospital Barão de Lucena (HBL), do Hospital Geral Otávio de Freitas (HGOF) e do Instituto Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP). As amostras clínicas foram coletadas no período de julho de 2006 a dezembro de 2008. E todos os participantes foram submetidos a um questionário epidemiológico e de histórico pessoal (Anexo A) sendo esses dados posteriormente inseridos num banco de dados, para análise estatística.

6.2 Classificação dos pacientes

Os pacientes que foram considerados suspeitos de ter TB foram aqueles que procuraram o serviço de saúde (nos hospitais participantes da pesquisa) e apresentaram dois ou mais dos seguintes sintomas - perda de peso, imagem radiológica sugestiva de TB, teste tuberculínico de Mantoux reator ($> 10\text{mm}$), tosse por mais de 15 dias, febre prolongada não esclarecida, histórico de contato com adulto bacilífero, sobretudo nos menores de 15 anos de idade.

Os pacientes inicialmente suspeitos, após definição diagnóstica, foram agrupados ou classificados como segue:

- a) **TB doença:** indivíduos que confirmaram a doença através da detecção do *M. tuberculosis* em amostra clínica, através de exame direto (baciloscopia positiva para BAAR) ou cultura. E, nos casos onde esses exames convencionais deram negativos, ou não foi possível realizá-los, foram considerados casos de TB aqueles indivíduos com quadro clínico ou radiológico

compatível com TB ativa, com teste tuberculínico reator ou que tiveram boa resposta ao tratamento específico.

- b) **TB infecção:** sem manifestações clínicas e radiológicas da doença; exames bacteriológicos (quando possível) negativos; teste tuberculínico positivo ($\geq 10\text{mm}$) – em crianças não vacinadas com BCG ou vacinadas há mais de dois anos e $\geq 15\text{ mm}$ em crianças vacinadas com BCG há menos de dois anos⁵⁵, e história de contato com adulto portador de tuberculose bacilífera;
- c) **TB descartada:** pacientes nos quais foi afastada a presença de TB por falta de dados clínicos, epidemiológicos, laboratoriais suficientes que permitissem confirmar o diagnóstico. Ou ainda, naqueles com ausência de melhora clínica após início do tratamento específico, desde que não seja verificada resistência aos bacteriostáticos utilizados.

Além disso, foi incluído um grupo controle, denominado de **Sem TB**, que foram os indivíduos saudáveis. Portanto, todos apresentaram cicatriz vacinal de BCG, teste tuberculínico de Mantoux não reator, ausência de manifestações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais não compatíveis com TB e ausência de contato com adulto bacilífero.

6.2.2 Critérios de definição de caso de TB (Pulmonar ou extrapulmonar) - Padrão ouro

O diagnóstico foi dado de acordo com o Ministério da Saúde do Brasil⁵⁶ e os critérios modificados da Sociedade Torácica Americana⁵⁷: através da presença do *M. tuberculosis* na baciloscopia ou cultura. No entanto, se esses exames forem negativos (situação muito comum na TB infantil e formas paucibacilares da doença), a elucidação diagnóstica foi baseada nos critérios clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e melhora clínica evidente após início da terapêutica específica^{56,57,58}.

6.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes sabidamente portadores de HIV/SIDA; portadores de doenças crônicas como: nefropatias, cardiopatias e fibrose cística; ou que estivessem em uso de corticosteróide ou drogas imunossupressoras por mais de 15 dias e outros tipos de pneumopatias crônicas.

6.4 Critérios de perda

Pacientes que faleceram durante a pesquisa antes da definição diagnóstica; que, por vontade própria, desistiram de participar do estudo ou aqueles que não retornaram ao hospital para acompanhamento clínico. Ainda foram excluídos pacientes que tiveram sua ficha clínica-epidemiológica da pesquisa preenchida de maneira incompleta; cujas amostras coletadas foram contaminadas ou insuficientes para o processamento no laboratório e repetição da extração de DNA ou STNPCR (quando negativa na primeira vez).

6.5 Coleta e descontaminação das amostras biológicas

- a) Sangue: 5,0mL de sangue dos adultos e crianças com mais de 5 anos e 2,5mL dos menores de 5 anos por punção venosa usando tubos (Vacutainer®, Becton and Dickson, England) contendo EDTA, mantendo-os à temperatura ambiente (de 25 a 30°C) até serem processadas no CPqAM (isolamento dos leucócitos e extração).

- b) Urina: 30 mL de urina dividida em 3 coletas consecutivas e diárias em tubos secos estéreis (10 mL) de cada paciente. As amostras de urina foram coletadas após higienização pessoal prévia e descarte do primeiro jato. Em lactentes menores de 2 anos ou pessoas sem controle de micção, as coletas foram feitas através de saco coletor. As amostras poderiam ser armazenadas em geladeira até serem entregues as 3 juntas ao Laboratório de Imunoepidemiologia. No laboratório do CPqAM foi feito um *pool* (centrifugação em tubo para centrífuga de 50 mL dos 30 mL juntos das urinas de cada paciente por 20min a 3000rpm) com as três urinas que em seguida foi descontaminado segundo o protocolo de Petroff^{59,60}.
- c) Escarro: Foram coletados 1-5 ml de escarro obtido através eliminação espontânea em tubo seco rosqueado e estéril, em uma única amostra com o paciente em jejum, ao acordar.
- d) Líquido Pleural: Foram coletados de 2-10 ml do líquido pleural em tubo contendo anticoagulante EDTA, dos pacientes internados que houvesse necessidade dessa coleta.
- e) Lavado bronco-alveolar: Foram coletados de 2-10ml de líquido bronco-alveolar seguindo o procedimento padrão de coleta do hospital onde o paciente estivesse sendo acompanhado.
- f) Líquor e outros fluidos biológicos: Foram coletados de 2-10 ml em uma única mostra em tubo seco e estéril e armazenados em geladeira até serem processados no CPqAM.

Todos os espécimes biológicos foram coletados antes do início de qualquer tratamento específico para tuberculose. Após a coleta, as amostras foram enviadas ao CPqAM num prazo máximo de 4h e estocadas entre 4 a 8° C, por não mais que 24 horas e descontaminadas pelo Método de Petroff^{60,61}, exceto sangue (que foi mantido à temperatura ambiente por no máximo 24h, sem descontaminar, e depois submetido à separação de células) e líquor.

6.6 Isolamento de Leucócitos

Após o recebimento do tubo com sangue, sem congelar, ele pôde ser guardado em temperatura ambiente até ser processado. Então diluiu-se 4 mL do sangue em 4 mL de PBS (pH = 7,2) em tubo Falcon[®] de 15 mL.

Em outro tubo Falcon[®] (15 mL), adicionaram-se 3mL de Ficoll Histopaque[®] gelado. O sangue homogeneizado com PBS foi adicionado ao tubo com o Ficoll lentamente pela parede do tubo com cuidado para não misturar e centrifugado por 30 min a 200rpm. Após centrifugação retirou-se o plasma (1ª camada) e o anel de células brancas. Dividiu-se a amostra em dois criotubos com tampa rosqueada, que foram congelados a -70°C até seu uso na extração.

6.7 Fluxograma das amostras clínicas

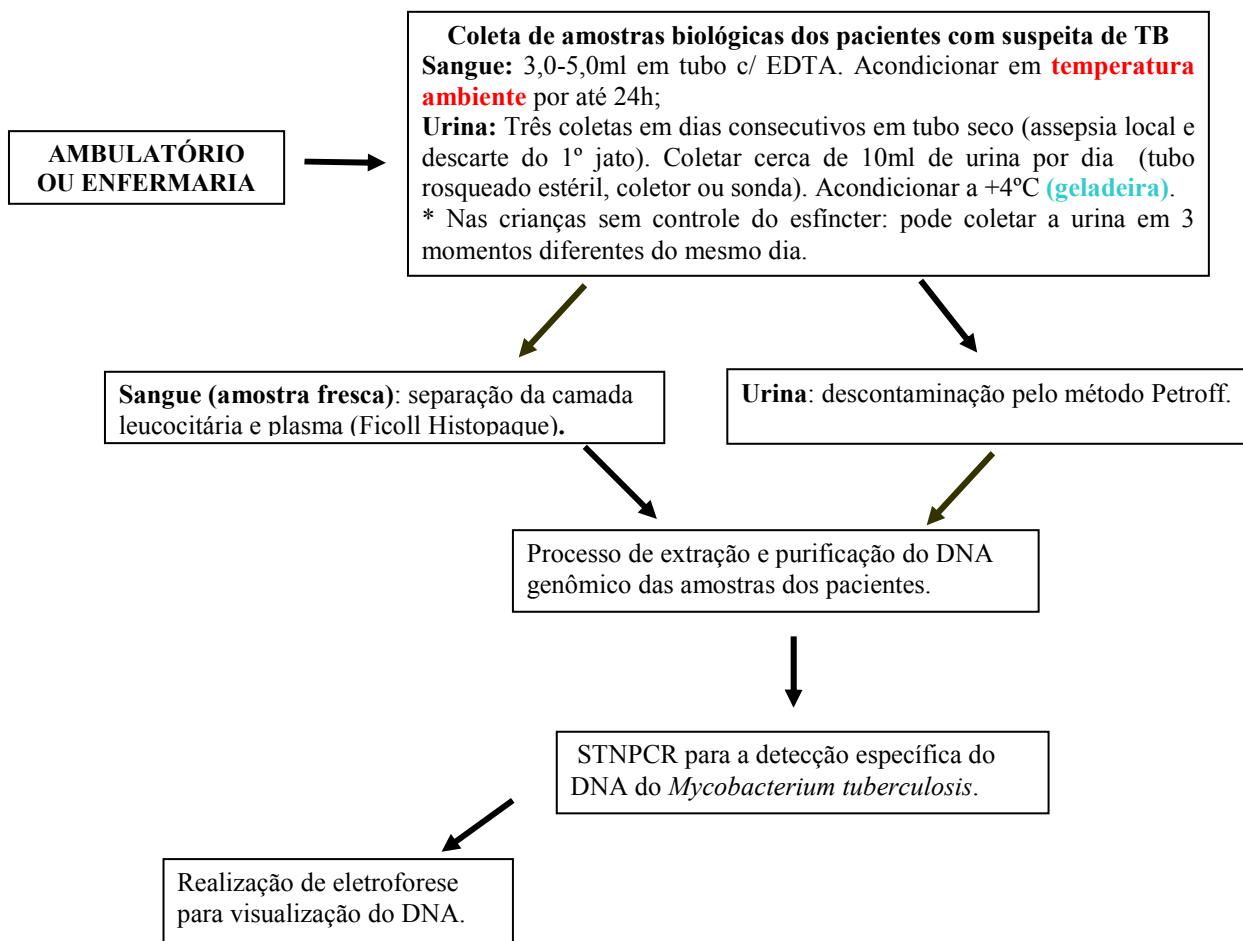


FIGURA 3: FLUXOGRAMA DA COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.

6.8 Cultura de *M. tuberculosis*

6.8.1 A partir de cepa de referência H37Rv

A partir de um tubo com culturas já crescidas da cepa de referência de *M. tuberculosis* (H37Rv), com uma alça de semeio descartável, raspam-se algumas colônias do meio que foram diluídas em outro tubo rosqueado estéril contendo 0,5mL de água milli-Q estéril e de 5 a 8 pérolas de vidro. Repetiu-se este passo até obter uma turvação razoável. Em seguida, as colônias foram agitadas em vórtex por aproximadamente 1min até formar uma “massa” branca de bactérias. Após formar essa massa densa de colônias, foi adicionado mais 0,5 mL de água milli-Q estéril. Num terceiro tubo rosqueado estéril, foram colocados 3 mL de água milli-Q estéril. Com uma pipeta de Pasteur, algumas gotas da suspensão bacteriana do segundo tubo foram diluídas no 3º tubo até este obter uma turvação equivalente à do tubo nº 1 da Escala de Mc Farland. A partir desta diluição, que equivale a 3×10^8 bactérias por mL, foram feitas diluições consecutivas de fator 10 para posterior avaliação da sensibilidade da cultura de *M. tuberculosis* em meio Löwenstein-Jensen. Todos os meios de Löwenstein-Jensen simples foram preparados pela equipe do Lab. de Imunoepidemiologia do CPqAM/FIOCRUZ.

6.8.2 A partir de amostras clínicas

Após descontaminação das amostras, exceto do sangue, o sedimento foi ressuscitado em 2 mL de água estéril. Em seguida, com pipeta de Pasteur, foram semeadas de 3 a 4 gotas (0,2 mL) do sedimento em 2 tubos de meio simples de Löwenstein-Jensen, em mais um tubo de meio Löwenstein-Jensen com ácido para-nitrobenzóico (PNB) e num terceiro tubo com meio Löwenstein-Jensen e hidrazida do ácido tiofeno (TCH). Os tubos foram colocados em estufa a

37°C e lidos uma vez por semana até a 8ª semana, ou antes, assim que houvesse crescimento de colônias em algum dos tubos, de acordo com as normas do Manual de Bacteriologia da Tuberculose⁶¹.

6.9 Extração do DNA

6.9.1 Cepa de referência (H37Rv) de *M. tuberculosis*

Extração utilizando o kit Genomic Prep cells and tissues (Amershan Biosciences®, Suécia), seguindo o protocolo do fabricante.

6.9.2 Em amostras clínicas

Uma alíquota de 500µl da amostra previamente preparada (itens 6.5 ou 6.6) foi centrifugada a 13000 rpm por 10 min e acrescida de 3 lavagens com tampão Tris-EDTA (TE). O sedimento foi ressuspenso em 100µl de TE 1x e aquecido em termobloco à 100°C por 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubotubo e adicionado 5µl de resina (Sephaglas BandPrep Kit, Amersham Pharmacia Biotech) mais 2 vezes o volume final de Iodeto de Sódio (0,9g/mL) e manualmente agitado por 5 min. Em seguida foi incubado à temperatura ambiente por mais 5 min. Os tubos foram centrifugados por 1 min, descartando o sobrenadante e adicionando 200µl de etanol a 70%, novamente agitando e centrifugando por 1 min. O sedimento foi deixado à temperatura ambiente durante 60 min. para a secagem completa e ressuspenso com 40µl de TE sendo incubado em banho-maria a 50°C por 10 min. Após centrifugação por 1 min, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, previamente numerado e estocado a -20°C, até a ocasião de uso na PCR⁶².

6.10 Nested-PCR em único Tubo (STNPCR)

Os métodos baseados em STNPCR seguiram os princípios propostos por Abath, Werkhauser e Melo³⁵, e foram otimizados para amostras de sangue e urina humanos. A sequência de inserção IS6110 (GenBank accession Nº. X52471) foi o alvo para PCR. Os oligonucleotídeos externos utilizados foram TJ5 (5' - CCG CAA AGT GTG GCT AAC - 3') e TJ3 (5' - ATC CCC TAT CCG TAT GGT G - 3'), que amplificam um fragmento de 409pb e os oligonucleotídeos internos foram o OLI5 (5' - AAC GGC TGA TGA CCA AAC - 3') e STAN3 (5' - GTC GAG TAC GCC TTC TTG TT - 3'), amplificando um fragmento de 316pb⁶³.

A reação de amplificação foi realizada em um termociclador automático (Eppendorf Gradiente). A primeira etapa de PCR consistiu em 15 ciclos (94⁰C - 1 min; 57⁰C - 1 min e 72⁰C - 1 min), enquanto que a segunda etapa consistiu em 45 ciclos (94⁰C - 1min; 60⁰C - 1min e 72⁰C - 1min). Os primeiros 15 ciclos da reação continham apenas 0,5 pmoles de oligonucleotídeos externos em um volume final de 50µl contendo Tris-HCl a 200mM, com pH=8.4, KCl 500mM (Tampão 10x), MgCl₂ a 2,5mM, dNTP 2mM x 5µl, e 5U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen). Os oligonucleotídeos internos, antes do início da PCR, foram diluídos na mesma proporção com água e azul de bromofenol (2µg/ml), contendo 50pmoles de cada oligonucleotídeo e em seguida esta mistura foi fixada na superfície interna da tampa dos microtubos abertos, numa estufa a 37°C ou temperatura ambiente. Para que os oligonucleotídeos internos passassem a fazer parte dos 45 ciclos finais da PCR, os mesmos foram eluídos da superfície interna do microtubo através de interrupção breve da PCR após o 15º ciclo de reação e feitas repetidas inversões dos tubos para que entrassem em contato com a mistura de reação e passassem a participar dos ciclos subsequentes da PCR³⁵.

Todas as reações da STNCPCR tiveram um controle negativo (10µl de TE) e um controle positivo (2µl de DNA de cepa de *M. tuberculosis* H37Rv e mais 8µl de água milli-Q estéril). Todas as amostras negativas foram repetidas para confirmação do resultado. Também se utilizou um controle negativo e um controle positivo para cada reação de PCR.

6.11 Eletroforese

Os amplicons gerados através da Nested-PCR em único tubo foram separados em gel de agarose a 2,0%, corados com brometo de etídio (20µl de brometo em 1l de tampão TE 1x), e visualizados sob luz ultravioleta. O marcador de peso molecular utilizado foi o Low Mass Ladder (Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia, EUA).

7 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR

7.1 Concentração ótima dos oligonucleotídeos internos e externos

A fim de obter-se a melhor eficiência dos pares dos oligonucleotídeos utilizados na STNPCR, foi feito um gradiente de concentração deles mantendo fixa a concentração do par interno e variando-se a do externo. Para tanto, a concentração do par de oligonucleotídeos internos foi fixada em 50pmol nos 5 microtubos de reação onde fez-se o gradiente de concentração do par externo, que variou de 50 a 0,005pmol de oligonucleotídeos.

7.2 Especificidade dos oligonucleotídeos

Para verificação da especificidade dos oligonucleotídeos foram feitas reações de STNPCR nas mesmas condições já descritas em diversos tubos contendo genoma de várias espécies de micobactérias (*M. avium*, *M. smegmatis* e *M. fortuitum*) e DNA humano (de indivíduo sadio). Num tubo foi colocado como *template* para a reação de PCR, DNA humano; nos outros tubos colocaram-se DNA das micobactérias atípicas (*M. smegmatis*, *M. smegmatis* e *M. fortuitum*) e último tubo, colocou-se apenas água (controle negativo) para avaliar o anelamento inespecífico entre os oligonucleotídeos (formação de dímeros).

7.3 Teste de eficiência do método de extração

A técnica foi otimizada primeiramente com DNA genômico purificado de cepa de *Mycobacterium tuberculosis* de referência (H37Rv) e posteriormente em amostras biológicas. Foram feitas curvas com fator 10 de diluição para a verificação do limite de detecção de DNA do *M. tuberculosis* pela técnica de STNPCR.

Com o objetivo de verificar a eficiência do método de extração escolhido⁶², dois testes em paralelo foram realizados, ambos usando como diluente amostra de urina humana de um mesmo indivíduo saudável. Para os dois testes, alíquotas da urina foram “contaminadas” com quantidade conhecida (concentração a partir do tubo nº 1 da Escala de Mc Farland = 3×10^8 bacilos/mL) de bacilo de *M. tuberculosis* (cepa H37Rv). Posteriormente foram feitas diluições consecutivas, de fator 10, dos bacilos da concentração 3×10^8 a 3×10^2 . Essas amostras foram descontaminadas seguindo o mesmo protocolo de Petroff^{60,61}. A partir daí, foram feitas duas curvas de diluição paralelas retirando 500µL de cada tubo de urina a partir da concentração 3×10^7 até 3×10^2 .

A primeira curva foi extraída seguindo o protocolo original de extração de Rossetti e colaboradores⁶², já a segunda curva, sofreu uma modificação. Como este protocolo consiste em três lavagens iniciais com tampão TE, a fim de diminuir a presença de inibidores da PCR na amostra em questão, pode haver perdas de bacilos durante seu processamento, conseqüentemente haveria perda de sensibilidade na detecção do DNA. Para tanto, na segunda curva foi realizada apenas uma lavagem com TE, ao invés das 3 preconizadas. O resto do protocolo foi seguido de acordo com o proposto por Rossetti e colaboradores⁶², em ambas as curvas.

8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

8.1 Banco de dados e amostra

Foi construído no programa SPSS 10.0 for Windows um banco de dados para armazenar os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de todos os pacientes. Para análise das variáveis foi aplicado o teste do Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher quando necessário. A amostra foi de conveniência, de acordo com a demanda de pacientes suspeitos que procuraram atendimento médico nos hospitais citados anteriormente, assim como as os controles, que também foram provenientes desses hospitais. Para a avaliação dos testes foram calculados a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo com seus respectivos intervalos de confiança. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares utilizados foram o Epi Info 6.04d e o SPSS 10.0.

Visto que utilizamos uma amostra de conveniência, o n da amostra não foi previamente calculado para avaliarmos o desempenho da STNPCR na detecção do *M. tuberculosis* em amostras clínicas de pacientes com TB. Validações da STNPCR para diagnóstico de tuberculose em amostras de urina e sangue humanos são temas de outros projetos desenvolvidos no Laboratório de Imunoepidemiologia do CPqAM/FIOCRUZ.

8.2 Definições de Sensibilidade, Especificidade, Valores preditivos positivo e negativo do teste diagnóstico

Por definição sensibilidade é “[...] a proporção de verdadeiros positivos entre todos os doentes [...], avalia a capacidade de o teste detectar a doença quando ela está de fato presente”⁶⁴. Especificidade é definida como “[...] a proporção de verdadeiros negativos entre todos os sadios. [...] avalia a capacidade de o teste afastar a doença quando ela está ausente”⁶⁴. Os valores positivos são definidos como “...a probabilidade de doença, dado os resultados de um teste

diagnóstico”⁶⁴, que pode ser positivo ou negativo. O valor preditivo positivo (VPP) é “[...] a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo”⁶⁴. Já o valor preditivo negativo (VPN) é definido como sendo “[...] a proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com teste negativo”⁶⁴.

Foi utilizada a sensibilidade combinada dos testes em paralelo (STNPCR nas diferentes amostras clínicas) para calcular o desempenho do teste em cada tipo de amostra clínica utilizada. Considera-se um resultado positivo se pelo menos um dos testes resultar positivo. Este é um tipo de teste múltiplo, onde a Sensibilidade combinada dos testes em paralelo é calculada pela seguinte fórmula⁶⁴:

$$S_p = S_a + S_b - S_a \times S_b$$

Para a especificidade combinada também se utilizou a combinação em paralelo dos testes (STNPCR nas diferentes amostras clínicas) segundo a fórmula matemática:

$$E_p = E_a \times E_b$$

Os testes em paralelo geralmente são utilizados quando o clínico necessita dos resultados com urgência para um diagnóstico mais rápido. Pois se considera positivo o teste como um todo, se pelo menos em uma das amostras ele for positivo⁶⁴.

8.3 Estatística nas amostras clínicas

Para os cálculos estatísticos das variáveis referidas sobre o desempenho da STNPCR nas amostras clínicas especificadas, foi utilizado o programa SPSS 10.0 for Windows, onde foi construído um banco de dados e feitas as tabelas 2x2 e frequência das variáveis desejadas; e o Epi Info 6.04d, onde foram realizadas as análises das tabelas 2x2 para obter-se os valores de p , intervalos de confiança e teste do X^2 . Quando necessário, foi usado a correção de Yates para o valor de p e teste do X^2 .

Para efeito de cálculo, diferenciamos em dois grupos de pacientes as amostras de sangue coletadas destes. No primeiro grupo foram coletadas amostras de sangue total (como descrito no item 6.5, acima), de julho/2006 a agosto/2007, que foram diretamente processadas na extração⁶², sem qualquer tratamento prévio. O segundo grupo teve suas amostras de sangue coletadas, de

março/2007 a novembro/2008, da mesma maneira (item 6.5), porém foram submetidas a posterior separação de sua porção vermelha (hemácias e grupo heme) do restante. A porção vermelha foi descartada e a porção que sobrou foi separada em leucócitos e plasma (item 6.6). Denominou-se então de “sangue separado” estas amostras que passaram pelo processo de isolamento dos leucócitos e plasma e desprezo da porção vermelha do sangue total.

Para verificar a real sensibilidade e especificidade da STNPCR, analisamos a sensibilidade e especificidade no grupo com amostras de sangue total e os mesmos indicadores no grupo onde houve separação do sangue. Primeiramente fizemos os cálculos dos testes em paralelo nas amostras de sangue separadas. Juntamos os resultados da STNPCR em leucócitos e plasma e concluímos a primeira sensibilidade e especificidade em paralelo. Em seguida, comparamos os resultados das sensibilidades e especificidades dos dois grupos para concluir qual seria a melhor forma de analisar o sangue na STNPCR.

Posteriormente, calculamos a sensibilidade, especificidade, intervalo de confiança, teste do χ^2 e p-valor da STNPCR em urina. Depois fizemos também o cálculo do desempenho total da STNPCR utilizando amostras de urina + sangue total; e urina + leucócitos e plasma.

Para a avaliação do desempenho geral da técnica, consideramos todas as amostras coletadas por paciente (sangue, urina, líquido pleural, lavado gástrico, escarro, líquido céfalo-raquidiano, lavado brônquio-alveolar, líquido ascítico, aspirado traqueal e líquido pericárdico) e classificamos o paciente como positivo ou negativo.

9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os participantes do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para coleta das amostras biológicas necessárias. No caso do paciente ser menor de idade, seu responsável deu consentimento por escrito através do termo de consentimento livre e esclarecido equivalente (Anexo B). Os indivíduos que participaram do estudo como controles assinaram um termo livre e esclarecido autorizando sua participação e a coleta de suas amostras, após esclarecimento da pesquisa e de sua classificação como controle apenas (Anexo C).

Este projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CEP-CPqAM/FIOCRUZ), apresentada no Anexo IV, e teve a anuência dos hospitais supracitados participantes da pesquisa por meio de carta oficial e assinada pelo responsável no Serviço referente.

10 RESULTADOS

10.1 Otimização da concentração dos oligonucleotídeos

A melhor proporção dos oligonucleotídeos encontrada foi na concentração fixada em 0,5pmol/50pmol dos oligonucleotídeos externos e internos, respectivamente, como visualizado na figura 4.

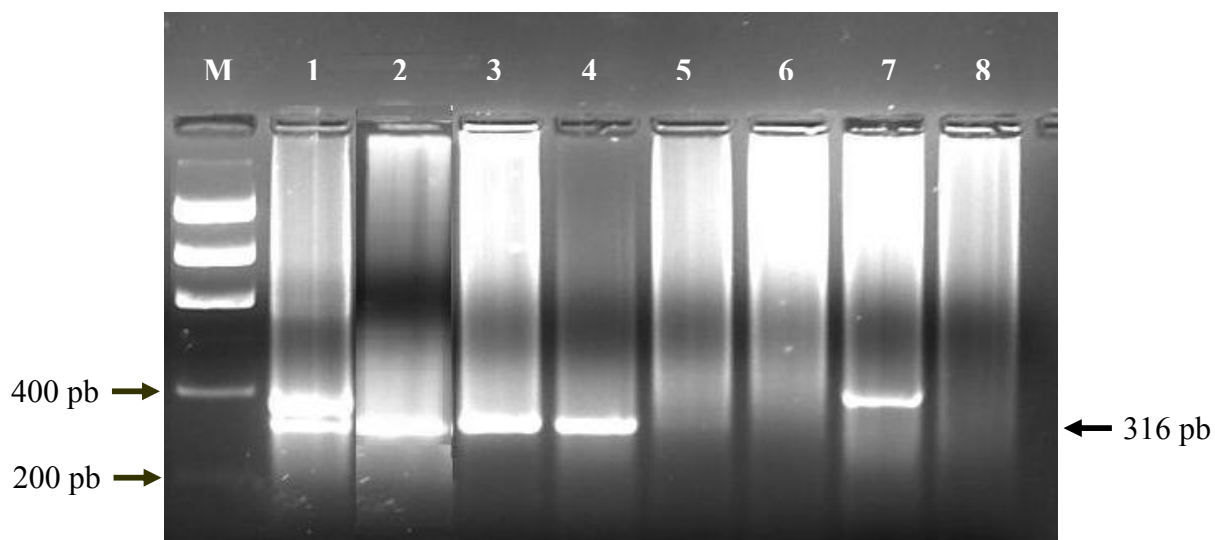


FIGURA 4: GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS EXTERNOS (TJ5/TJ3) E INTERNOS (OLI5/STAN3).

Nota: A faixa M representa o marcador de peso molecular Low mass Ladder®, nas faixas 1 a 8: [50/50 pmol], [5/50 pmol], [0,5/50 pmol], [0,05/50 pmol], [0,005/50 pmol], [0/50 pmol], [50/0 pmol] de oligonucleotídeos externos/internos, respectivamente e o C- sem DNA.

10.2 Especificidade dos oligonucleotídeos

Houve amplificação apenas do genoma do complexo *M. tuberculosis*. O teste de especificidade dos oligonucleotídeos TJ5/TJ3 e OLI5/STAN3 através da STNPCR, revelou uma amplificação específica do IS6110 no genoma do *M. tuberculosis* e do *M. bovis*. Não foi

observada amplificação do segmento do tamanho esperado com DNA genômico purificado de *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* e DNA humano (Figura 5).

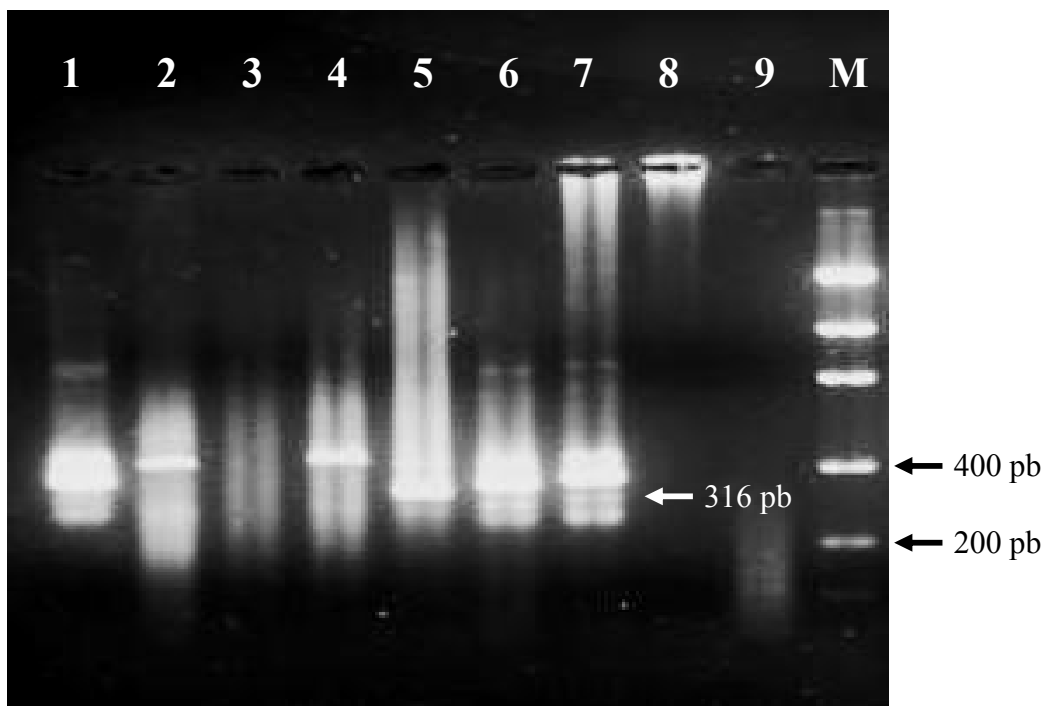


FIGURA 5: ESPECIFICIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS COM DNA DE VÁRIAS ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS.

Nota: Faixas 1-9, respectivamente: DNA de *M. bovis*; *M. fortuitum*; *M. smegmatis*; *M. avium*; *M. tuberculosis* 100pg, 10pg, 1pg de DNA; DNA humano, C-PCR. M = marcador de peso molecular low mass Ladder.

10.3 Curva de diluição de DNA genômico purificado diluído em água

Para avaliar o limite de detecção de DNA pela STNPCR, fizemos uma curva de calibração (fator de diluição 10) com DNA genômico purificado de *M. tuberculosis* que variou de 1ng – 1ag (Figura 6). Utilizamos os oligonucleotídeos TJ3/TJ5 na concentração de 0,5pmol e os oligonucleotídeos internos na concentração de 50pmol. O limite de detecção foi de até 1ag (equivalente a 0,001fg) de DNA.

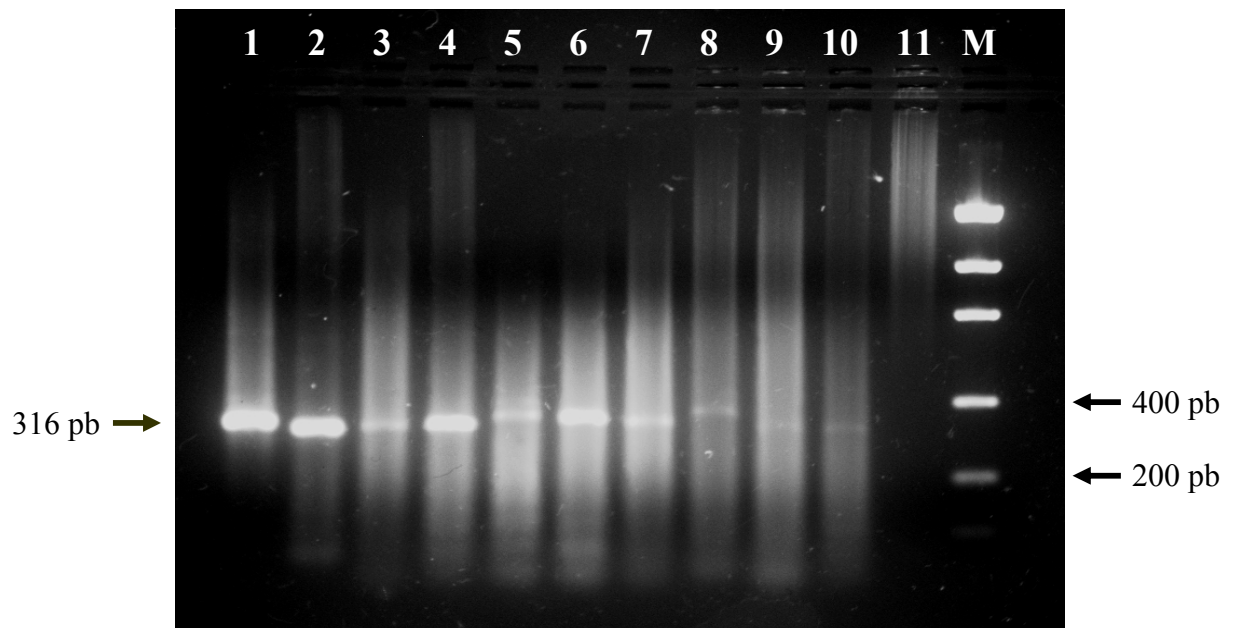


FIGURA 6: GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DILUÍDO EM ÁGUA.
Nota: Curva de DNA variando de 1ng a 1ag (faixas 1 – 10), C- da PCR (Faixa 11) e marcador de peso molecular (Faixa M – Low Mass Ladder). O limite observado foi de 1ag de DNA.

10.4 Curva de diluição de DNA genômico diluído em urina humana

O limite de detecção através da STNPCR de DNA diluído em urina humana foi de 10ag (Figura 7). Foram utilizadas as mesmas condições da PCR e concentrações dos oligonucleotídeos. Também foram feitos testes para verificar a amplificação de DNA em amostras de pacientes com e sem TB.

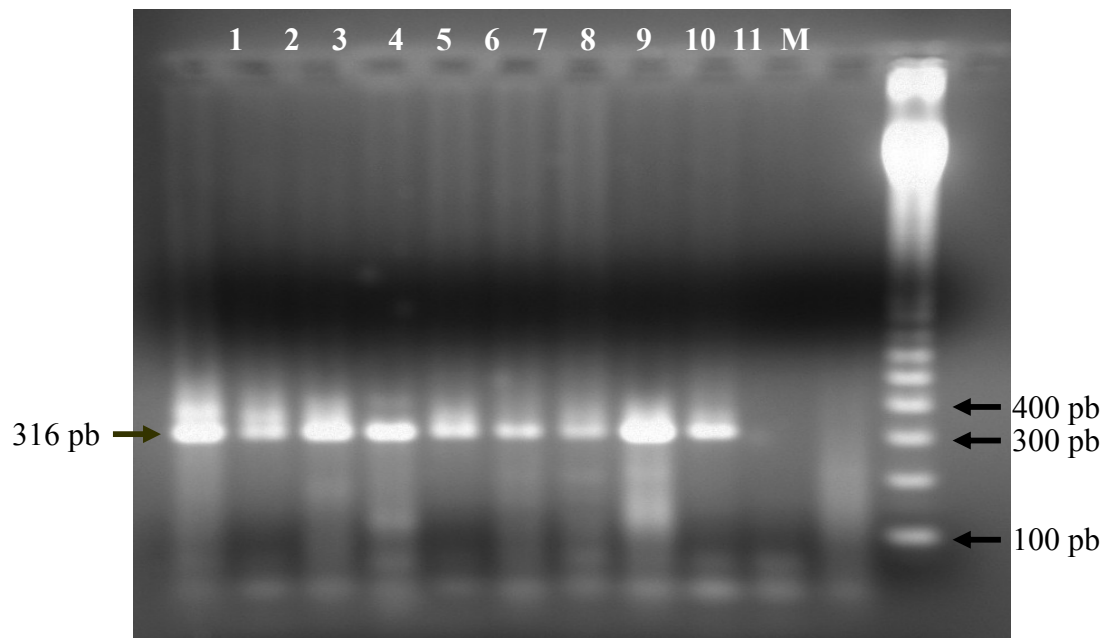


FIGURA 7: GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DILUÍDO EM URINA. Nota: Curva de DNA variando de 1ng a 1ag (faixas 1 – 10), C- da PCR (Faixa 11) e marcador de peso molecular (Faixa M – 100 Base Pair Ladder, Amersham).

10.5 Curva de diluição de DNA genômico diluído em sangue total humano

O limite de detecção através da STNPCR de DNA de *M. tuberculosis* diluído em sangue total humano foi de 1pg (Figura 8). Foram utilizadas as mesmas condições da PCR e concentrações dos oligonucleotídeos. Também foram feitos testes para verificar a amplificação de DNA em amostras de sangue total de pacientes com e sem TB.

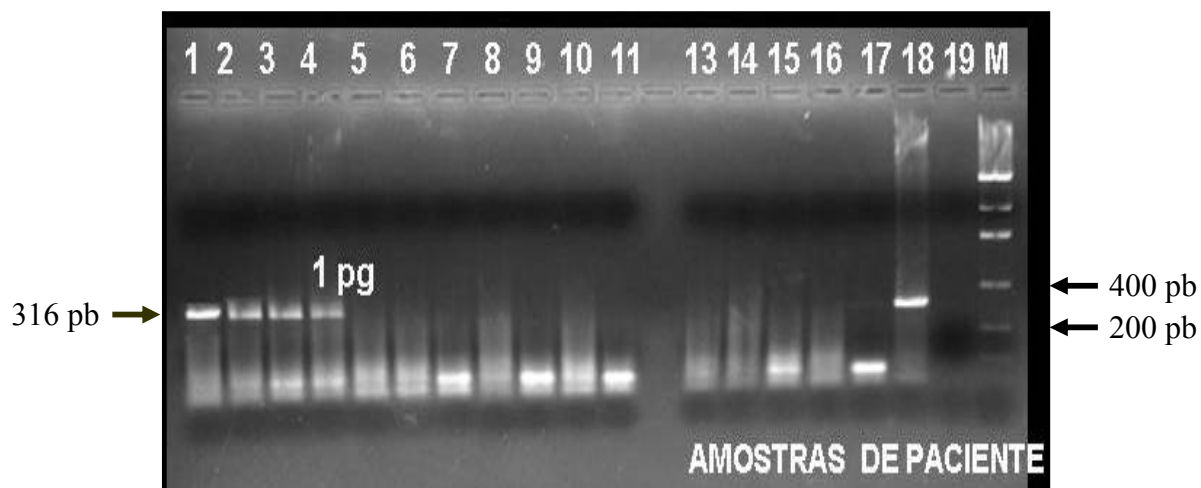


FIGURA 8: GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DILUÍDO EM SANGUE TOTAL.

Nota: Curva de DNA variando de 1ng a 0,1ng (faixas 1 – 11), C- da extração. Amostras de sangue de pacientes (Faixas 13 – 17), C+ da PCR (Faixa 18) e C-PCR (faixa 19). Marcador de peso molecular (Faixa M – Low Mass Ladder).

10.6 Teste do método de extração - Eficiência x perda de sensibilidade

Tendo como base o método de extração descrito por Rossetti et al⁶², foram feitos testes modificando-se algumas etapas do método original. A amostra utilizada para avaliar a extração foi urina humana construindo-se duas curvas de diluições distintas, porém com as mesmas concentrações de bacilos em cada.

Na curva onde o protocolo de extração não foi modificado (com 3 lavagens consecutivas de TE) a STNPCR conseguiu detectar DNA de *M. tuberculosis* até a concentração de 3×10^2 bacilos/mL. Na outra curva, onde se modificou a quantidade de lavagens com TE (1 lavagem apenas), o limite mínimo de detecção de DNA pela STNPCR foi de 3×10^3 bacilos/mL (Figura 9).

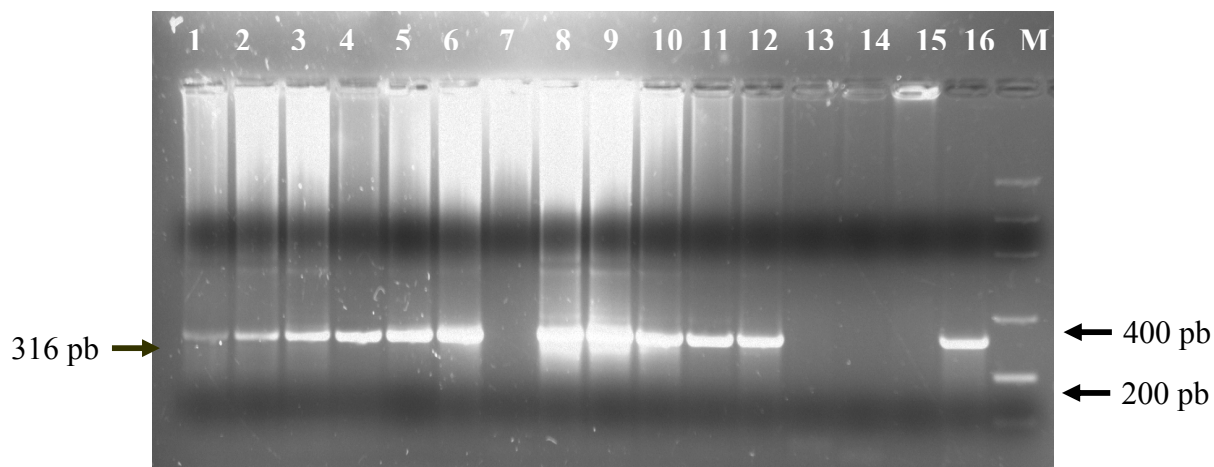


FIGURA 9: *M. TUBERCULOSIS* CRESCIDAS EM MEIO LÖWENSTEIN-JENSEN ADICIONADAS À URINA DE INDIVÍDUO SADIO.

Nota: Faixas de 1-6 (3×10^7 a 3×10^2) – extração segundo protocolo de Rossetti et al.⁶², C- da extração. Faixas de 8-13 (3×10^7 - 3×10^2) – extração segundo protocolo de Rossetti et al.⁶² modificado e C- da extração na faixa 14. Faixas 15, 16 e M, C- da PCR, C+ da PCR e marcador de peso molecular (Low Mass Ladder), respectivamente.

10.7 Casuística

Neste estudo, observacional analítico e prospectivo, foram incluídos 104 indivíduos de ambos os sexos, sendo 88 (84,62%) com suspeita inicial da doença e 16 (15,38%) controles. A idade variou de 0 a 69 anos (mediana de 30,0 anos) e o hospital de onde recebemos mais amostras clínicas foi o HC-UFPE, com um total de 98 amostras provenientes de 48 pacientes. As informações clínico-epidemiológicas estão descritas na tabela 1.

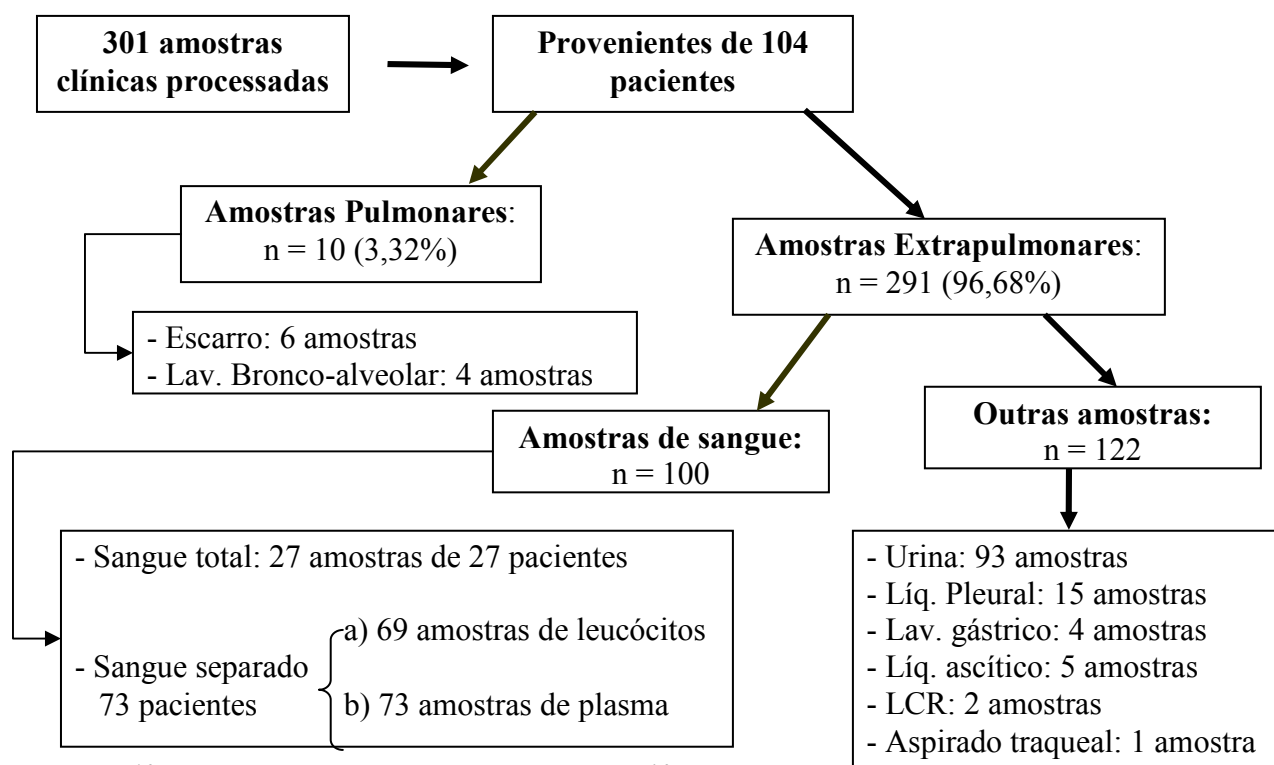
Tabela 1: Características clínicas e demográficas dos 104 pacientes do estudados (continua).

Características (Frequência e percentual)	Em crianças (idade ≤ 15 anos)	Em adultos (idade > 15 anos)	Total
Procedência			
Ambulatório	20 (66,67%)	31 (41,89%)	51 (49,04%)
Enfermaria	10 (33,33%)	43 (58,11%)	53 (50,96%)
Sexo			
Masculino	21 (70%)	30 (40,54%)	51 (49,04%)
Feminino	9 (30%)	44 (59,46%)	53 (50,96%)

Tabela 1: Características clínicas e demográficas dos 104 pacientes do estudados (conclusão).

Características (Frequência e percentual)	Em crianças (idade ≤ 15 anos)	Em adultos (idade > 15 anos)	Total
Classificação dos grupos			
TB Infecção	3 (10%)	0	3 (2,88%)
TB Doença	19 (63,33%)	42 (56,76%)	61 (58,65%)
TB Descartada	8 (26,67%)	16 (21,62%)	24 (23,08%)
Controles	0	16 (21,62%)	16 (15,38%)
Tipo de doença			
Pulmonar	14 (73,68%)	18 (42,86%)	32 (52,46%)
Extrapulmonar	5 (26,32%)	24 (57,14%)	29 (47,54%)

Foram processadas ao todo 301 amostras clínicas proveniente de 104 pacientes. Dentre elas, 10 (3,32%) foram pulmonares e 291 (96,68%) extrapulmonares, que se dividiram entre: amostras de sangue total, de sangue separado, de urina, de lavado gástrico, de líquido pleural, líquidos pericárdico, ascítico e líquido cefalo-raquidiano (LCR) e de aspirado traqueal (Figura 10).

**FIGURA 10:** FLUXOGRAMA DAS AMOSTRAS COLETADAS DOS 104 PACIENTES.

Após coleta e processamento das amostras, foi verificado que 4 pacientes já haviam iniciado o tratamento específico com antituberculosstáticos. Portanto, apesar de terem seu diagnóstico final confirmado como TB doença, foram excluídos das análises da STNPCR.

10.8 Desempenho da STNPCR em amostras clínicas

10.8.1 Sensibilidade e Especificidade

10.8.1.1 Em amostras de sangue

a) Sangue total

Em alguns pacientes a STNPCR foi processada no sangue total e a sensibilidade encontrada nesse tipo de amostra foi de 61,11% (IC = 36,1 – 81,7) e especificidade de 100% (59,8 – 100), com p -valor altamente significativo (resultados exatos de Fisher, $p = 0,004$), ver na tabela 2.

Tabela 2: Desempenho da STNPCR em amostras de sangue total de pacientes com suspeita de TB:

STNPCR em amostras de sangue total	Com TB (doença + infecção)	TB descartada	Total
Positivo	11	0	11
Negativo	7	8	15
Total	18	8	26

Nota: VPP = 100% (67,9 – 100); VPN = 53,3% (27,4 – 77,7).

b) Leucócitos

Nos outros pacientes que tiveram amostras de sangue coletadas, foram feitas PCRs diferentes em cada amostra dividida do sangue total (leucócitos e plasma). Nos Leucócitos a sensibilidade foi de 48,65% (IC = 32,2 – 65,3) e especificidade de 96,55% (80,4 – 99,8), visto na tabela 3. O valor de p foi altamente significativo ($p < 0,001$ pela correção de Yates).

Tabela 3: Desempenho da STNPCR em amostras de leucócitos de pacientes com suspeita de TB:

STNPCR em amostras de leucócitos	Com TB (doença + infecção)	TB descartada	Total
Positivo	18	1	19
Negativo	19	28	47
Total	37	29	66

Nota: VPP = 94,74%(71,9-99,7); VPN = 59,58% (44,3-73,3) .

c) Plasma

A sensibilidade da STNPCR nas amostras de plasma foi de 25% (IC = 13,2-41,5) e especificidade de 96,67% (IC = 80,9-99,8). O valor de p ($p = 0,011$), usando a correção de Fisher, foi significativo (tabela 4).

Tabela 4: Desempenho da STNPCR em amostras de plasma de pacientes com suspeita de TB:

STNPCR em amostras de plasma	Com TB (doença + infecção)	TB descartada	Total
Positivo	10	1	11
Negativo	30	29	59
Total	40	30	70

Nota: VPP = 90,91% (57,1-99,5); VPN = 49,15% (36,1-62,4).

d) Sensibilidade e especificidade em paralelo das amostras de Leucócitos e Plasma

Como o plasma e os leucócitos provêm de um único tipo de amostra clínica (o sangue), foram calculadas a sensibilidade e a especificidade em paralelo dessas duas amostras. Portanto, a sensibilidade total das amostras de leucócitos e plasma, calculada em paralelo, foi de 61,49% e a especificidade em paralelo foi de 93,33%.

10.8.1.2 Em amostras de urina

Considerando apenas os pacientes com TB (doença ou infecção) que tiveram amostras de urina coletadas, a sensibilidade do teste encontrada foi de 26,92% (IC = 16-41,3) e a especificidade de 97,3% (IC = 84,2-99,9). O valor de $p < 0,01$, com a correção de Yates (ver tabela 5).

Tabela 5: Desempenho da STNPCR em amostras de urina pacientes com suspeita de TB:

STNPCR em amostras de urina	Com TB (doença + infecção)	TB descartada	Total
Positivo	14	1	15
Negativo	38	36	74
Total	52	37	89

Nota: VPP = 93,3% (66,0-99,7); VPN = 48,65% (37,0-60,5).

10.8.1.3 Em amostras de sangue + urina

a) Sangue total + urina

Utilizando os cálculos de sensibilidade e especificidade em paralelo, juntando os resultados de sangue total e urina, os resultados foram de 71,58% de sensibilidade e 97,3% de especificidade.

b) Sangue separado + urina

A sensibilidade em paralelo do sangue separado e da urina foi de 71,85% e a especificidade de 90,81%.

10.8.1.4 Em sangue (total e separado) e urina de acordo com a faixa etária e a forma da doença

Tabela 6: Desempenho da STNPCR de acordo com a faixa etária em cada tipo de amostra clínica:

Faixa etária	Sensibilidade (%) (IC 95%)	Especificidade (%) (IC 95%)	VPP (%) (IC 95%)	VPN (%) (IC 95%)
STNPCR em Sangue total				
≤ 15 anos	50 (13,9-86,1)	100 (59,8-100)	100 (31-100)	72,7 (39,3-92,7)
> 15 anos	41,2 (19,4- 66,5)	87,1 (69,2-95,8)	63,6 (31,6-87,6)	73 (55,6-85,6)
STNPCR em Leucócitos				
≤ 15 anos	36,4 (12,4-68,4)	100 (59,8-100)	100 (39,6-100)	53,3 (27,4-77,7)
> 15 anos	42,9 (25-62,6)	87,1 (69,2-95,8)	75 (47,4-91,7)	62,8 (46,7-76,6)
STNPCR em Plasma				
≤ 15 anos	22,2 (3,9-59,8)	100 (59,8-100)	100 (19,8-100)	53,3 (27,4-77,7)
> 15 anos	30,4 (14,1-53)	87,1 (69,2-95,8)	63,6 (31,6-87,6)	62,8 (46,7-76,6)
STNPCR em Urina				
≤ 15 anos	25 (6,7-57,2)	100 (59,8-100)	100 (31-100)	47,1 (23,9-71,5)
> 15 anos	29,7 (16,4-47,2)	87,1 (69,2-95,8)	73,3 (44,8-91,1)	50,9 (37-64,7)

10.8.1.5 Em qualquer amostra clínica do mesmo paciente

Considerando o paciente como “positivo” (quando pelo menos uma de suas amostras clínicas for positiva) ou “negativo” (quando todas as suas amostras clínicas processadas forem negativas), foi avaliada a STNPCR (tabela 7). A sensibilidade geral da técnica foi de 75,41% (62,4 – 85,2) e a especificidade de 89,7% (74,8 – 97,4). O valor de p foi altamente significativo e o teste do $X^2=37,83$ pela correção de Yates.

Tabela 7: Desempenho da STNPCR em diversas amostras clínicas de pacientes com suspeita de TB:

STNPCR em todas as amostras clínicas	Com TB (doença + infecção)	TB descartada	Total
Positivo	46	4	50
Negativo	15	35	34
Total	61	39	100

Nota: VPP = 92% (79,9-97,4); VPN = 70% (55,2 – 81,7).

10.8.1.6 Em qualquer amostra clínica de acordo com o tipo da doença

A sensibilidade e especificidade, calculada em paralelo, da STNPCR em sangue total + urina nas formas pulmonares da doença foi de 72,23% e nas formas extrapulmonares foi de 72,72%. Utilizando as amostras de sangue separado (leucócitos + plasma) + urina, a sensibilidade foi de 61,02% na TB pulmonar e de 82,79% na TB extrapulmonar. As sensibilidades, especificidades e valores preditivos da STNPCR nas amostras clínicas estudadas em relação à forma da doença estão descritas na tabela 8.

Tabela 8: Desempenho da STNPCR em pacientes com TB de acordo com a forma da doença:

Forma da doença	Sensibilidade (%) (IC 95%)	Especificidade (%) (IC 95%)	VPP (%) (IC 95%)	VPN (%) (IC 95%)
STNPCR em Sangue total				
TB Pulmonar	33,3 (1,3-64,6)	89,7 (74,8-96,7)	50 (17,4-82,6)	81,4 (66,1-91,1)
TB extrapulmonar	54,5 (24,6-81,9)	89,7 (74,8-96,7)	60 (27,4-86,3)	87,5 (72,4-95,3)
STNPCR em Leucócitos				
TB Pulmonar	40,9 (21,5-63,3)	89,7 (74,8-96,7)	69,2 (38,9-89,6)	72,9 (57,9-84,3)
TB extrapulmonar	58,3 (28,6-83,5)	89,7 (74,8-96,7)	63,6 (31,6-87,6)	87,5 (72,4-95,3)
STNPCR em Plasma				
TB Pulmonar	20,8 (7,9-42,7)	89,7 (74,8-96,7)	55,6 (22,7-84,7)	64,8 (50,6-77)
TB extrapulmonar	50 (17,4-82,6)	89,7 (74,8-96,7)	50 (17,4-82,6)	89,7 (74,8-96,7)
STNPCR em Urina				
TB Pulmonar	16,7 (5,5-38,2)	89,7 (74,8-96,7)	50 (17,4-82,6)	63,6 (49,5-75,9)
TB extrapulmonar	40 (21,8-61,1)	89,7 (74,8-96,7)	71,4 (42-90,4)	70 (55,2-81,7)

A sensibilidade da STNPCR (paciente positivo quando pelo menos uma amostra clínica dele foi positiva) nos pacientes com TB pulmonar foi de 65,6% (IC = 46,8 – 80,8; $X^2= 16,1$ e $p<0,01$) e nos com TB extrapulmonar foi de 75,86% (IC = 56,1-89,0; $X^2= 20,81$ e $p<0,01$). A especificidade foi de 89,74% (IC = 74,8-96,7) considerando os controles negativos mais os pacientes com suspeita inicial de TB, mas com diagnóstico clínico da doença excluído (tabela 9).

Tabela 9: Desempenho da STNPCR em pacientes com TB de acordo com a forma da doença:

STNPCR em todas as amostras clínicas	TB Pulmonar	Não é TB	TB Extrapulmonar	Não é TB
Positivo	21	4	22	4
Negativo	11	35	7	35
Total	32	39	29	39

VPP Pulmonar = 84% (63,1-94,7); VPN Pulmonar = 76,09% (60,9-86,9).

VPP Extrapulmonar = 84,62% (64,3-95,0); VPN Extrapulmonar = 83,33% (68,0-92,5).

11 DISCUSSÃO

A tuberculose está classificada como uma das principais doenças infecciosas do mundo. Certamente é uma das mais antigas doenças que afligem a humanidade. No nosso país ela vem se firmando como uma das principais causas de morbimortalidade, atingindo indistintamente diversas faixas etárias e classes sociais⁶⁵. A TB no Brasil foi considerada em alguns momentos da história como uma doença “emergente” ou “reemergente”. No entanto, ela nunca “desapareceu” para ressurgir, ao contrário, ela sempre esteve presente na população brasileira⁶⁶. No entanto, em alguns momentos, negligenciou-se sua importância como problema de saúde pública nacional.

Analisando o perfil da TB e sua detecção e as políticas públicas de combate à doença, Ruffino-Netto, fez as seguintes observações: “Por que esse baixo percentual de detecção? Por que não se procura mais tuberculose? A crença geral das pessoas é que a tuberculose é doença do passado. Teria sido esta também a crença dos médicos? Secretarias Municipais / Estaduais de Saúde? Das Universidades do país? E do próprio Ministério da Saúde? É difícil responder esta questão e principalmente refutar a hipótese embutida que ela contém.” Ele concluiu que um decrescente percentual de detecção da doença ao longo de algumas décadas e diferentes políticas de saúde não se deviam à diminuição da doença no país e sim à subnotificação da doença e subnotificação de mortalidade por TB⁹.

Muitas políticas públicas de controle da doença foram implantadas no Brasil ao longo de várias décadas. Como a utilização de esquemas terapêuticos padronizados, a implantação da vacinação com BCG intradérmica e a criação do Plano Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), dentre outras medidas. Algumas políticas de controle da doença e outras de prevenção. Dentre as medidas de prevenção, o diagnóstico precoce tem se destacado como uma das mais eficientes e necessárias medidas no combate à TB⁹. A efetividade das ações de controle da tuberculose é diretamente proporcional à participação conjunta dos profissionais de saúde, dos governos e das comunidades. É fundamental que os profissionais de saúde tenham participação ativa, não apenas na busca ativa de doentes em suas Unidades de Saúde, como capacitando membros das comunidades de forma a torná-los capazes de identificar os suspeitos e encaminhá-los para o serviço especializado⁶⁷.

Cerca de dois terços dos trabalhos publicados na literatura médica atual sobre pesquisa básica e aplicada, que abordam assuntos como bacteriologia de micobactérias e tuberculose,

concentram-se no potencial de aplicação de novas técnicas moleculares em laboratórios de rotina. Essas pesquisas têm geralmente o objetivo principal de desenvolver métodos que proporcionem uma identificação cada vez mais rápida de espécies de micobactérias e do perfil de sensibilidade destas às drogas antimicrobianas²².

A PCR vem se destacando como uma das promissoras técnicas moleculares para diagnóstico de doenças infecciosas⁶⁸. Ela é um teste relativamente rápido, e que consegue detectar menos de 10 organismos em amostras clínicas⁶⁹. Embora existam relatos de que a PCR simples seja útil para a detecção do *M. tuberculosis*, a associação de duas PCR, a Nested-PCR, potencializa a sensibilidade e especificidade da técnica⁴⁷.

A NPCR ocorre em duas etapas consecutivas (havendo troca de tubos e reagentes), sendo realizada quando há necessidade de aumento tanto na sensibilidade quanto na especificidade utilizando dois pares de oligonucleotídeos (interno e externo), tornando-a um pouco mais demorada em relação a PCR simples e a STNPCR. Entretanto, por haver abertura e manipulação dos tubos com os produtos de amplificação gerados na primeira PCR, a possibilidade de contaminação cruzada é alta entre a primeira e a segunda reação de PCR⁴⁷. A STNPCR minimiza esses riscos de contaminação cruzada por não haver abertura dos tubos entre as duas etapas de PCR. Portanto, ela é bastante útil para o diagnóstico, onde a sensibilidade é importante e o potencial de contaminação deve ser minimizado, além de apresentar alta especificidade com o alvo^{34,70}.

Com o intuito de minimizar a competição dos oligonucleotídeos externos e internos durante as reações subsequentes de PCR pelo DNA alvo, testes foram realizados para escolha da melhor proporção de concentração desses oligonucleotídeos. O objetivo deste experimento era garantir a exaustão dos iniciadores externos ainda durante a primeira etapa de amplificação, de forma que o produto diagnóstico produzido de 316pb, referente ao “amplicon” dos iniciadores internos, fosse alcançado de maneira mais eficiente³⁴.

Para a escolha da proporção dos oligonucleotídeos, levou-se em consideração a que obteve melhor eficiência. Entende-se como melhor eficiência a obtenção de apenas uma banda bem visível e definida, equivalente aos produtos amplificados na 2ª reação de PCR e presença de pouco ou nenhum dímero de oligonucleotídeo ou anelamento inespecífico com eventuais fragmentos de DNA. A proporção adotada nos experimentos produziu uma banda diagnóstica intensa resultante da amplificação dos oligonucleotídeos internos. Houve aparente ausência de

produto resultante da amplificação pelos oligonucleotídeos externos e também de dímeros ocasionados por amplificação inespecífica dos oligonucleotídeos.

Na verificação da especificidade dos oligonucleotídeos em relação ao DNA humano e ao genoma de outras micobactérias, realmente a banda específica do padrão do complexo *M. tuberculosis* só foi verificada no DNA do *M. bovis* e do *M. tuberculosis*, que foi a banda única com tamanho de 316pb.

Como previsto nas análises teóricas do alvo de amplificação adotado, como ele é específico do genoma das micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, não houve amplificação característica do fragmento de 316pb no DNA humano. Assim como não houve amplificação no DNA extraído de outras micobactérias atípicas.

O limite de detecção obtido pela STNPCR de DNA purificado diluído em água foi mais sensível que os métodos convencionais de diagnóstico (a baciloscopia é de aproximadamente 10.000 bacilos/mL de amostra e a cultura varia de 10 a 100 bacilos/ml⁷¹). A STNPCR conseguiu detectar uma quantidade de DNA menor ao presente em um único bacilo, que é de 5fg^{72,73}, o que significa que se naquela amostra coletada tiver apenas um bacilo, ainda que ele esteja fragmentado, a técnica é capaz de detectá-lo. Os resultados encontrados demonstraram que o sistema de PCR utilizado neste estudo foi mais sensível que em outros sistemas previamente testados para a detecção de DNA purificado do *M. tuberculosis*^{71,72}.

Ribhi e colaboradores⁷⁴ demonstraram que a PCR simples, através de curva de diluição seriada de DNA purificado de *M. tuberculosis*, foi capaz de detectar menos de 50 células bacterianas (0,25pg de DNA bacteriano), limite de detecção inferior ao detectado pela STNPCR nesta pesquisa. Outro estudo utilizando PCR simples também encontrou o limite de detecção de DNA genômico de um bacilo (ou 5fg de DNA)⁷³, o que demonstra a superioridade de sensibilidade de uma Nested-PCR em relação a uma PCR simples nesses dois casos citados.

Analisando a STNPCR para detecção do alvo IS6110 em amostras clínicas sua sensibilidade caiu um pouco em relação ao DNA purificado do *M. tuberculosis*. O que já era esperado devido às amostras clínicas conterem inibidores inerentes a cada uma. Em urina, este sistema manteve uma boa sensibilidade frente aos métodos convencionais. Sua sensibilidade neste tipo de amostra clínica de paciente ainda foi proporcionalmente menor que a quantidade de DNA contido no genoma total de um bacilo (10ag e 500ag, respectivamente).

A sensibilidade da STNPCR em urina humana foi 10 vezes menor que a sensibilidade de detecção do DNA purificado diluído em água milli-Q, que teoricamente não contém inibidores da PCR. Considerando a presença de muitos sais, proteínas e outros microorganismos neste tipo de amostra (que é bem contaminada, *in natura*), a STNPCR conseguir detectar pequenos fragmentos de DNA de um bacilo, é um resultado eficiente e melhor do que a baciloscopia (5.000 a 10.000 bacilos/mL) e a cultura (10 a 100 bacilos/mL). No entanto, outro estudo refere que a sensibilidade da PCR em amostras clínicas é menor do que na cultura⁶⁹. Também se deve considerar que os métodos de descontaminação e extração utilizados estão tendo um bom desempenho de suas funções, estão conseguindo limpar a amostra e deixá-la bem concentrada e purificada, conservando o DNA dos bacilos alia presentes.

Para o bom desempenho de uma PCR, vários fatores têm que ser levados em consideração. Um deles é o método de extração de DNA⁷⁵. Para avaliar a eficiência do método escolhido, levamos em consideração a quantidade de DNA extraído no final do processo, diante da perda de bacilos, *versus* a diminuição dos inibidores da PCR em decorrência dos procedimentos de lavagens das amostras. Segundo os resultados obtidos, realmente, o procedimento com 3 lavagens da amostra com o tampão TE melhora a extração provavelmente pelo ganho na qualidade da amplificação de DNA na PCR em detrimento da perda de bacilos. As lavagens diminuem a quantidade de sais e proteínas na amostra de urina (utilizada nos testes) e melhoram a qualidade da amostra que vai ser amplificada pela STNPCR. Então, o “custo” (eventual perda de bacilos da amostra com as sucessivas lavagens) foi menor que o benefício (maior eficácia na “limpeza” da amostra clínica com diminuição dos inibidores) das 3 lavagens consecutivas da amostra com tampão TE no procedimento de extração utilizado neste estudo.

A STNPCR também foi analisada utilizando amostras clínicas de sangue e urina para analisar o real desempenho da técnica como auxiliar no diagnóstico da TB. Foram realizados então, testes com sangue total na SNTPCR em algumas amostras de pacientes e outros testes com sangue separado em leucócitos e plasma, além da urina.

As amostras de sangue foram separadas em dois grupos: sangue total e sangue separado. O objetivo era analisar o efeito inibitório do grupo heme e do EDTA, contidos nas amostras de sangue total, na STNPCR. Com a separação dos leucócitos e plasma, o EDTA utilizado na coleta foi diluído e as hemácias foram retiradas.

A amostra de sangue total contém um grande inibidor da PCR que é o grupo heme da hemoglobina^{76,77}. Além disso, ainda existe o anticoagulante utilizado, o EDTA, embora tenha menor efeito inibidor que outros anticoagulantes, como a heparina. Portanto, já era esperado que o limite de detecção de DNA em amostras de sangue total fosse bem menor que o limite com DNA purificado e diluído em água (1×10^6 vezes menor). A detecção em amostras de sangue da sequência de inserção IS6110 do *M. tuberculosis* tem sido considerada como mais sensível que a cultura e com especificidade semelhante a esta^{72,78,79}.

Teoricamente, se separarmos a parte vermelha do sangue e trabalharmos apenas com as células brancas e o plasma, eliminaríamos o maior fator responsável por inibição da PCR neste tipo de amostra clínica (o grupo heme das hemácias). Segundo alguns autores^{80,81}, a hemoglobina pode inibir a PCR porque os íons Fe^{++} competem com os íons Mg^{++} , fundamentais na ação da enzima DNA polimerase. E mesmo depois do processo de extração do DNA, esses inibidores podem permanecer na amostra por parecem ser resistentes à fervura, não são destruídos por proteinases e não se dissolvem em solventes orgânicos.

Portanto, passamos a separar o sangue em 3 fases: parte vermelha (desprezada); leucócitos e o plasma, a fim de minimizar os efeitos inibitórios do grupo heme. Outros estudos obtiveram bons resultados de PCR utilizando apenas as células brancas e plasma das amostras sanguíneas^{81,82}.

Antes de serem feitas as análises das amostras clínicas dos pacientes do estudo, verificou-se que 4 deles, com diagnóstico clínico de TB, já haviam iniciado o tratamento específico para a doença no momento da coleta de suas amostras. A título de curiosidade, as amostras desses pacientes foram processadas e o resultado da STNPCR neles foi negativo. O que confirma que, com o início do tratamento, por ele ser bastante agressivo principalmente nos primeiros meses, já há destruição em grande quantidade e com eficiência dos bacilos, conseqüentemente de seu DNA.

Dentro da casuística deste estudo, não houve diferença significativa entre os sexos, apesar de a escolha dos indivíduos participantes ter sido aleatória, de acordo com a demanda dos hospitais. Também não houve diferença significativa entre a procedência dos pacientes quanto ao serviço do hospital (se ambulatório ou enfermaria), o que contribui para que não haja um viés na análise dos dados que poderiam ser atribuídos ao tipo de paciente estudado. Visto que pacientes de enfermarias, por conta do internamento, recebem uma atenção diferente de pacientes que vêm apenas para atendimento ambulatorial.

Dezesseis controles adultos (com teste de Mantoux não reator e ausência de histórico de contato com adulto bacilífero) foram testados na STNPCR, onde 100% foram negativos. Não foram testados controles na faixa etária pediátrica devido a questões éticas, pois quem responderia pelo consentimento para a coleta de sangue e urina das crianças seriam seus responsáveis legais. No entanto, a coleta de sangue gera um pequeno incômodo direto para a própria criança, sem esta poder “optar” em ser participante ou não. Devido a isto, para preservar a integridade física dos possíveis controles infantis, decidimos em não utilizar este grupo como controle. Ainda considerando que não haveria um grande viés em não utilizar um grupo controle nas duas faixas etárias.

No grupo de crianças suspeitas de TB, prevaleceu o diagnóstico final de TB doença, assim como entre os adultos. A classificação de TB infecção entre os adultos é pouco utilizada na clínica, por isso nenhum dos suspeitos adultos foi classificado como tal. Quando se avaliou a forma clínica da doença, nas crianças prevaleceu a forma pulmonar. Contudo, nos adultos a forma mais prevalente foi a extrapulmonar, assim como afirmaram Sanchez-Albisua e colaboradores⁸³ que as formas extrapulmonares são mais frequentes com o aumento da idade.

Os primeiros estudos clínicos utilizando PCR demonstraram um excelente desempenho desta (sensibilidade de 95% a 96% e especificidade em torno de 100%) quando testados em amostras de escarro de pacientes com bacterioscopia positiva. Entretanto, em pacientes BAAR negativos à baciloscopia de escarro, a PCR não teve o mesmo nível de qualidade: sensibilidade de 48% a 53% e especificidade de 96% a 99%. Esses resultados levaram o Centro de Controle de Doenças (CDC = Center of Disease Control), no Estados Unidos, a recomendar, em 1996, o uso da PCR apenas nos pacientes com escarro positivo na baciloscopia. Posteriormente, analisando resultados de outro trabalho de investigação clínica em que a PCR foi testada em presidiários, com sensibilidade de 87,5% para pacientes BAAR negativos ao escarro, o CDC modificou sua recomendação para, em algumas situações, a PCR ter seu uso em diagnóstico de TB em amostras de escarro negativas à baciloscopia⁸⁴. Utilizando-se desta parcela da população com suspeita de TB e baciloscopia negativa ao escarro, a PCR pode ser de grande utilidade.

Aproximadamente 30% da população com suspeita da doença iniciam o tratamento específico de forma empírica e o fazem sem a confirmação bacteriológica. A decisão do tratamento é tomada baseada apenas no quadro clínico e radiológico do paciente⁸⁵. Portanto, a

PCR seria principalmente útil nesses casos para que se evite o início do tratamento desnecessariamente ou que este seja feito com alguma confirmação laboratorial (molecular).

A PCR apresenta variações de sensibilidade e especificidade dependentes de vários fatores, tais como: amostra clínica, método de extração de DNA, oligonucleotídeos escolhidos, padrão-ouro utilizado, tipo dos pacientes analisados (se crianças, se portadores de HIV, se idosos, se adultos competentes, se a forma da TB for pulmonar ou extrapulmonar), variação da PCR (NPCR, STNPCR, PCR simples), método de detecção do produto amplificado (via eletroforese ou detecção colorimétrica), eliminação dos inibidores etc⁷⁵. A partir destes esclarecimentos, analisaremos os resultados desse trabalho nas condições já descritas.

Enfatizamos que os resultados da STNPCR não foram utilizados como critérios de definição de nenhum dos casos de tuberculose. O resultado da STNPCR apenas foi repassado para o médico que acompanhava clinicamente o paciente quando este já tinha tido seu diagnóstico definido por outros critérios.

Foram feitas análises estatísticas da STNPCR em relação a cada tipo de amostra clínica estudada. A maioria das amostras processadas foram extrapulmonares, independente da forma clínica da doença, isto porque as amostras padrões deste estudo eram sangue e urina e outros líquidos foram coletados de acordo com a necessidade de cada paciente.

Considerando-se o tipo de amostra e a forma clínica da doença em relação à faixa etária, não houve amostra pulmonar de nenhuma criança (escarro nem BAL). O que pode confirmar a dificuldade de expectoração e produção de escarro pelas crianças. A maioria das amostras coletadas nas crianças foram apenas as padronizadas pelo estudo (sangue e urina), independente da forma clínica da doença. Estes tipos de amostras são muito menos invasivas e são acessíveis a praticamente todas as crianças. Mesmo naquelas que ainda não conseguem controlar a micção, visto que existem sacos coletores de urina que podem ser colocados nas fraldas. O sangue e a urina podem ser coletados sem promover riscos, causar maiores danos ou traumas à criança. Estas amostras, diante da dificuldade em obter-se outros tipos de espécimes biológicos nesta faixa etária, que requer cuidados especiais, podem ser as amostras de escolha para investigação inicial da TB, em paralelo à investigação clínica baseada na sintomatologia e epidemiologia.

Na análise de cada tipo de amostra clínica avaliada, o sangue teve uma positividade maior nos adultos do que nas crianças. Prevalecendo a positividade maior nas formas extrapulmonares da

doença com este tipo de amostra. A urina, tanto em adultos, quanto em crianças, apresentou maior positividade nas amostras de doentes com TB extrapulmonar, o que já era esperado porque a urina é uma amostra de sítio inespecífico e extrapulmonar.

Pode-se observar que as amostras de sangue tiveram uma boa positividade na forma da TB infecção em crianças. Não se podem tirar muitas conclusões a este respeito porque apenas tiveram 3 pacientes no estudo com este diagnóstico clínico. No entanto, novos trabalhos podem ser desenvolvidos neste grupo de crianças com diagnóstico de TB infecção e confirmação da infecção através de métodos moleculares direto do sangue. Analisando individualmente cada um desses três pacientes, verificamos que em todos eles a STNPCR conseguiu detectar presença de DNA em sua amostra de sangue. Seja no paciente que teve sua amostra de sangue total analisada (positiva); ou os outros dois que tiveram suas amostras de sangue separadas em leucócitos e plasma, onde em um foi detectado DNA do *M. tuberculosis* no plasma e no outro nos leucócitos. Um estudo avaliando a detecção de DNA do complexo *M. tuberculosis* em sangue total de crianças conseguiu uma sensibilidade da técnica de PCR (Nested-PCR convencional) de 26,1% em crianças com diagnóstico de TB infecção. Este mesmo estudo também achou uma sensibilidade da NPCR em sangue total de crianças com TB doença de 26,2%⁸⁶.

Para avaliação de um novo teste diagnóstico, alguns critérios estatísticos devem ser avaliados, tais como a sensibilidade, especificidade e acurácia do teste. Ainda se podem levar em consideração os valores preditivos do teste (positivo e negativo), aqui analisados independente da prevalência da doença na população estudada, que tem maior valor para o médico clínico do que para o teste em si, e ainda os valores de verossimilhança (positivo e negativo). Portanto, essas propriedades do teste diagnóstico é que vão definir o seu grau de incerteza quanto ao resultado, além de “um bom juízo crítico por parte dos médicos”⁶⁴. Pois um teste diagnóstico nada mais é do que interpretações de possibilidades estatisticamente significantes.

O desempenho da STNPCR foi analisado a partir da sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, com seus respectivos intervalos de confiança para maior confiabilidade desses resultados. A primeira amostra avaliada foi o sangue total, coletada nos primeiros pacientes que participaram da pesquisa. A sensibilidade da STNPCR encontrada foi melhor do que a de um outro estudo muito semelhante, realizado pela mesma equipe, porém que utilizava a NPCR convencional com sangue total, onde apenas menores de 15 anos de idade foram analisados⁸⁶. Portanto, pode-se considerar que ajustes na técnica (como novos

oligonucleotídeos⁶³ e a não abertura dos tubos entre as duas fases da PCR) melhoraram o resultado final de todo o procedimento. De maneira geral, a sensibilidade da PCR em amostras de sangue varia de 20 a 96% em pacientes sem infecção por HIV, com infecção por *M. tuberculosis* e *M. bovis*^{82,86,87,88}.

Foram avaliadas amostras de sangue total periférico, porém sem utilizar sua parte vermelha, justamente por causa da hemoglobina, importante inibidor da PCR. Então essas amostras foram separadas em leucócitos e plasma. Elas foram analisadas separadamente na PCR e posteriormente, através de artifícios estatísticos, suas sensibilidades e especificidades foram “somadas”. Diante destes experimentos, os resultados, comparados aos da STNPCR em sangue total completo, foi diferente do esperado. Pois a sensibilidade calculada em paralelo das amostras de leucócitos e plasma não foi estatisticamente diferente à sensibilidade da amostra de sangue total completo.

Analisando as amostras individualmente, os leucócitos apresentaram uma sensibilidade maior que as amostras de plasma. Isto pode ser considerado devido aos bacilos de Koch serem intracelulares facultativos, normalmente eles se encontram no interior dos macrófagos, portanto, nos glóbulos brancos do sangue.

Num estudo utilizando apenas os leucócitos de sangue periférico de pacientes com TB, a sensibilidade da PCR encontrada em pacientes com TB pulmonar foi de 44,1%, com TB extrapulmonar foi de 19,2% e com TB disseminada foi de 10%⁸⁸. Entretanto, no nosso estudo encontramos uma sensibilidade maior nos pacientes com TB extrapulmonar (58,3%) do que nos portadores de TB pulmonar (40,9%). Portanto, podemos sugerir que amostras de sangue periférico podem ser importantes na detecção da tuberculose em todas as suas formas clínicas. Ainda que, teoricamente, amostras de sangue contenham uma baixa quantidade de bacilos circulantes e altos níveis de DNA humano (o que pode potencialmente ser um agente inibidor da PCR)⁸¹, este sistema de PCR utilizado no estudo demonstrou bom desempenho em sangue.

O desempenho da STNPCR em amostras de urina foi relativamente bom, devido à quantidade enorme de componentes da urina como sais, enzimas, outras bactérias que por ventura poderiam atrapalhar o processo de purificação de DNA. Ainda pela urina normalmente não ser o principal sítio de infecção da TB, visto que tivemos apenas dois casos de TB renal (ambos com PCR positiva na urina). Um estudo realizado com suspeitos de TB renal encontrou sensibilidades para a Nested-PCR utilizada, em urina, superiores a 78%⁸⁹. No entanto, apenas suspeitos de TB renal

(cuja probabilidade da PCR ser positiva na urina é grande, devido ao sítio de infecção ser os rins, produtores da urina) entraram no estudo citado. Diferente do nosso estudo, onde as urinas foram coletadas de todos os pacientes suspeitos de TB, seja ela na forma pulmonar ou nas mais diversas formas extrapulmonares.

Considerando que vários desses pacientes com PCR positiva na urina não teriam seu diagnóstico de TB confirmado por exames laboratoriais antes de iniciar o tratamento empírico, esta amostra clínica, somada a outros tipos de amostras do mesmo paciente, é importante para auxiliar na confirmação bacteriológica.

A urina é uma amostra de simples coleta, exceto em pacientes que sofrem de afecções renais (como pacientes a espera de transplantes ou com insuficiência renal crônica, por exemplo), não invasiva e que se pode obter um bom volume de amostra. A detecção de DNA de *M. tuberculosis* na urina através da PCR foi comprovada, tanto em pacientes com TB pulmonar como com TB extrapulmonar, mesmo que não seja TB renal^{90,91}.

Dentre os três tipos de amostras clínicas analisadas neste estudo (sangue total, sangue separado e urina), podemos afirmar que a urina obteve o desempenho menos eficiente do que o sangue (total ou separado). No entanto, se avaliarmos sua importância como incremento na sensibilidade da STNPCR no paciente como um todo, ou seja, somando a probabilidade de a PCR dar positiva em mais de uma amostra (a sensibilidade paralela do sangue + urina), indicamos o uso da urina também como amostra para investigação de TB, independente da forma clínica da doença, e principalmente nas formas extrapulmonares⁷³.

A coleta de mais de um tipo de amostra biológica do mesmo paciente potencializa a sensibilidade do exame naquele mesmo paciente. Rebollo e colaboradores descreveram que a sensibilidade das técnicas de PCR também pode ser aumentada quando se utiliza mais de uma amostra de diferentes espécimes do mesmo paciente, pois aumenta a probabilidade de positividade desta⁴³. Neste mesmo raciocínio, avaliamos a sensibilidade da STNPCR, no mesmo paciente, quando somadas as sensibilidades da técnica em amostras de sangue e urina. Sendo assim, a sensibilidade em paralelo da STNPCR em amostras de sangue e urina (seja utilizando o sangue total ou o sangue separado) foi melhor do que a de cada amostra em separado. Corroborando com os achados de Rebollo e colaboradores⁴³.

Não houve uma diferença significativa entre a sensibilidade calculada em paralelo para as amostras de sangue total junto com as de urina em relação às amostras de sangue separado

(leucócitos + plasma) e urina. Portanto, para uma melhor verificação de que tipo de tratamento ao sangue deve ser dado antes de processá-lo na STNPCR, deve-se continuar a análise comparativa entre os dois procedimentos (sangue total e sangue separado) com um n maior. Mesmo que na literatura^{80,81}, haja relatos de que se trabalhar apenas com a parte branca do sangue diminua a quantidade de inibidores, não conseguimos comprovar isto nos nossos experimentos com o n utilizado para as amostras de sangue.

Extrapolando os objetivos, avaliamos o desempenho da STNPCR em outros tipos de amostras clínicas dos mesmos pacientes. Como protocolo padrão, foram coletados de todos os pacientes amostras de sangue e urina. Se o paciente tivesse mais alguma secreção ou líquido corporal que houvesse necessidade de ser analisado, também fizemos a PCR para verificar a possibilidade de utilizar também outros fluidos corpóreos. E a análise da STNPCR levando em consideração todos os tipos de amostras biológicas teve um ganho de sensibilidade em relação às amostras de sangue e urina apenas. Entretanto, a especificidade teve uma queda relativa. Porém, como nenhum teste na prática consegue ter ao mesmo tempo uma sensibilidade excelente (pelo menos acima dos 90 a 95%) e uma especificidade tão boa quanto, podemos concluir que a STNPCR, como ferramenta diagnóstica, tem sua importância principalmente nos casos de investigação de TB em pacientes com baciloscopia negativa.

Em um estudo utilizando também a PCR como ferramenta diagnóstica da TB, Portill-Gòmez e colaboradores⁷³ confirmaram que esta técnica (e suas variações) pode ser um método bastante útil para diagnóstico de TB extrapulmonar. Eles utilizaram várias amostras clínicas de pacientes com TB, dentre elas a urina e o líquido pleural e conseguiram uma sensibilidade do método de 94% para todas as amostras clínicas avaliadas.

No nosso estudo, tivemos alguns pacientes com diagnóstico de TB afastado pelo médico que o acompanhava, porém em alguma das amostras clínicas analisadas pela STNPCR, ela foi positiva. E, desses 4 pacientes que tiveram seu diagnóstico clínico de TB excluído pelos médicos assistentes do serviço de saúde, todos tiveram algum outro indício de TB além do resultado positivo da STNPCR. Um deles teve teste positivo para o complexo *M. tuberculosis* também por outra técnica molecular, a Nested-PCR convencional (também específica para o complexo *M. tuberculosis*) realizada no sangue, urina e líquido pleural, sendo positiva no sangue. Além de a paciente ter uma radiografia de pulmão com alterações. Outro paciente com diagnóstico clínico de TB afastado, também apresentou uma radiografia de pulmão com alterações, e NPCR no

sangue positiva para o complexo *M. tuberculosis*. A terceira paciente fez dois testes tuberculínicos, porém ambos foram não reatores, ela teve perda de peso, febre por vários dias e evoluiu com um quadro de hepatoesplenomegalia de etiologia desconhecida. Essa paciente apresentou regressão espontânea no quadro e recebeu alta em boas condições clínicas. No entanto além da STNPCR positiva no sangue, ela também teve a NPCR positiva na mesma amostra de sangue.

Analisando a sensibilidade da STNPCR nas amostras clínicas estudadas em relação à faixa etária, exceto em sangue total, as outras amostras estudadas (sangue separado e urina) apresentaram melhor desempenho na faixa etária maior que 15 anos de idade. Provavelmente porque na idade pediátrica a TB desenvolve-se geralmente na forma paucibacilar^{73,92}, o que torna menos provável o encontro do bacilo em uma amostra clínica extrapulmonar. Também devido a isso que, quanto mais tipos diferentes de amostras clínicas forem coletadas de um mesmo paciente e de diferentes sítios de infecção ou não (tais como sangue, urina e líquido pleural, por exemplo), maior é a probabilidade de o teste ser positivo, caso o paciente tenha a doença. Rebollo et. al também afirmaram que a sensibilidade das técnicas de PCR também pode ser aumentada com mais de uma amostra de diferentes espécimes do mesmo paciente⁴³.

O sangue total apresentou uma sensibilidade melhor nas crianças do que nos adultos. Talvez isso tenha acontecido, ao contrário do que outro estudo encontrou⁸⁵, por conta do baixo número de amostras de sangue total estudado nas duas faixas etárias do nosso estudo. O uso de amostras de sangue para investigação de TB é muito importante nos casos onde há dificuldades em ser coletado outro tipo de amostra⁶², principalmente em crianças, que são paucibacilares.

Por outro lado, os resultados encontrados aqui corroboraram com a maioria dos estudos^{89,93} que abordam técnicas moleculares em amostras extrapulmonares para diagnóstico de TB, onde a sensibilidade da PCR é maior na forma clínica extrapulmonar da doença.

Por ser um método molecular de detecção de DNA, a SNTPCR não distingue entre DNA de bacilo viável ou não (que não levaria ao desenvolvimento da doença). Considerando que todas as medidas para evitar contaminações cruzadas foram tomadas, um resultado positivo na PCR de um paciente com cultura negativa, por exemplo, pode indicar a presença de bacilo não viável, principalmente naqueles que apresentam histórico de tuberculose ou contato com bacilífero no passado^{72,94}. Portanto, seus resultados devem ser interpretados com cautela e nunca dissociados da clínica do paciente. Segundo Morán et al., resultados positivos na PCR podem ser por causa de

uma infecção ativa por *M. tuberculosis* ou por uma tuberculose do passado que fica latente no organismo⁹⁵.

Além de poder auxiliar na confirmação do diagnóstico de TB no paciente, a STNPCR pode ser utilizada também para sugerir a possibilidade de desenvolvimento da TB e auxiliar o exame clínico-epidemiológico do paciente. Por ser um método de amplificação de DNA, a PCR pode detectar DNA de bactérias mortas e permanecer positiva até esses bacilos serem eliminados pelo organismo⁷², independente do desenvolvimento ou não da doença.

À especificidade da técnica pode ser atribuído 100%, levando em consideração que todas as amostras de sangue e urina dos controles foram negativas. Entretanto, quando a especificidade foi aplicada às amostras de todos os indivíduos (controles + pacientes suspeitos), esta variou dependendo do tipo de amostra. Pode-se considerar que, diante dos resultados da STNPCR com os controles, não a técnica tenha dado resultados falso-positivos, e sim o padrão ouro (critérios clínicos, laboratoriais e epidemiológicos) de alguns pacientes tenha sido falho em sua definição. Ainda encontramos pacientes onde a cultura de alguma amostra clínica sua deu positiva para micobactérias atípicas e a STNPCR foi negativa, comprovando a espécie-especificidade da técnica (resultados não mostrados).

Diante de um teste diagnóstico, para o clínico, é mais útil o resultado negativo de um teste sensível e o resultado positivo de um teste específico⁶⁴. É imprescindível lembrar que o médico deve sempre ter em mente a diferença entre significância estatística e significância clínica.

Como as formas mais graves da TB acontecem geralmente nas crianças e pacientes imunodeprimidos (meningite tuberculosa e a tuberculose miliar, que é uma forma disseminada da TB e acomete, sobretudo, lactentes), é importante que exista um método diagnóstico eficaz e rápido para detectar a doença nesse grupo. Ironicamente, estes grupos são os de maior dificuldade em se obter um resultado preciso sobre a doença, já que normalmente eles não têm expectoração espontânea, a forma da doença é paucibacilar e muitos de seus sintomas clínicos fogem ao padrão clássico da tuberculose pulmonar.

A tuberculose infantil enfrenta grandes desafios em seu controle e identificação. Talvez a maior prioridade para o controle dessa doença não seja a descoberta de uma nova vacina, mas sim melhores métodos diagnósticos para identificação da tuberculose ativa ou latente. Crianças com

TB latente devem ser identificadas assim que possível e terem iniciada a quimioprofilaxia para limitar uma futura propagação da epidemia⁹⁶.

A maior dificuldade com amostras extrapulmonares é que elas contêm poucos bacilos, como demonstram as sensibilidades da baciloscopia e cultura dessas amostras⁷³.

Este estudo corrobora com outros^{73,78}, de acordo com seus resultados gerais onde conclui-se que a PCR deve ser usada como uma ferramenta diagnóstica auxiliar principalmente nos casos de suspeita de TB extrapulmonar. Ainda nesta conclusão, a PCR pode ser o método de escolha para diagnóstico de TB nos casos onde a baciloscopia foi negativa, porém há uma forte suspeita clínica da doença ou infecção. E quando a baciloscopia for positiva, ainda assim a PCR pode ser útil para distinguir se o bacilo álcool-ácido resistente presente naquela amostra é ou não uma micobactéria do complexo *M. tuberculosis*⁷².

Charnace et al.⁹⁷ também afirmaram que a PCR é mais bem utilizada quando o diagnóstico da TB ativa é difícil e precisa de uma confirmação rápida para excluir outros diagnósticos.

O diagnóstico precoce da TB e a busca rotineira dos bacilíferos certamente trará uma maior detecção dos casos índices da doença e um impacto positivo nos programas de controle da tuberculose, permitindo um manejo terapêutico mais eficaz e interferindo na cadeia de transmissão⁹⁸.

Para se trabalhar com técnicas de PCR numa rotina laboratorial, deve-se levar em consideração o risco de contaminação cruzada nos resultado da STNPCR devido a eventuais contaminações das amostras na extração ou PCR, portanto, devem-se tomar todos os cuidados para evitar isso (2 tubos de controle negativo em cada extração e durante as reações de PCR também). Neste estudo encontramos dificuldades no seguimento clínico de alguns pacientes que não foram feitos por um mesmo profissional, o que pode ter interferido no diagnóstico final do paciente. Ainda existiram as dificuldades no resgate dos prontuários de cada paciente nos hospitais onde eles foram acompanhados para a finalização da ficha clínica-epidemiológica da pesquisa. Estas dificuldades podem ter gerado algum viés na pesquisa e ter interferido nos resultados do desempenho da técnica. Entretanto, como a situação de seleção de pacientes, diagnóstico e seguimento destes até o fim do tratamento não foram diferentes da situação rotineira dos indivíduos que chegam com suspeita de TB aos hospitais da rede SUS, desta maneira, o estudo conseguiu avaliar esta situação sem nenhuma interferência diferente da habitual.

Avaliando o custo e os benefícios da STNPCR como exame laboratorial para confirmação da TB, devemos levar em consideração principalmente a rapidez no resultado. Além de outras características importantes como a detecção de *M. tuberculosis* em pacientes paucibacilares, instituição do tratamento adequado precocemente, diminuição do tempo de internação de pacientes sem confirmação diagnóstica. Ela ainda permite a identificação das fontes bacilíferas e, portanto reduz a cadeia de transmissão. A padronização e desenvolvimento de novos sistemas de PCR tornam seu custo financeiro mais acessível, ressaltando que essa tecnologia deve ser utilizada apenas por centros de referência na investigação de casos que demandem diagnósticos mais rápidos. Sendo assim, seu custo é factível com a realidade deste perfil de pacientes⁹⁹.

Por causa da imprecisão na identificação de pacientes doentes, porém com baciloscopia negativa ou sem realização de cultura (pacientes paucibacilares ou com TB extrapulmonar) e da escassez de estudos na literatura com técnicas moleculares para a detecção do bacilo em amostras não respiratórias, é fundamental a realização de pesquisas com testes moleculares. Nas formas paucibacilares e extrapulmonares, ou disseminadas, da doença, onde o paciente não apresenta amostras respiratórias para confirmação do diagnóstico pelo padrão ouro (baciloscopia ou cultura), novas abordagens diagnósticas, mais sensíveis e específicas, em diferentes espécimes biológicas devem ser validadas. Além de os testes moleculares serem mais rápidos.

Baseado neste estudo pudemos concluir que, a STNPCR pode ser utilizada como uma ferramenta diagnóstica auxiliar para tuberculose. Entretanto, ela não deve ser usada como único método laboratorial de confirmação ou exclusão da doença. O diagnóstico da TB deve estar fundamentado na análise conjunta de vários parâmetros como baciloscopia, cultura, manifestações clínicas e a prova terapêutica, além da PCR quando estiver disponível⁴⁷.

12 CONCLUSÕES

- a) STNPCR - ferramenta útil para somar-se aos métodos convencionais de investigação da doença;
- b) Importante principalmente em pacientes paucibacilares com baciloscopia negativa ou nas formas extrapulmonares;
- c) Tanto na faixa pediátrica quanto na idade adulta a STNPCR é bastante específica;
- d) Não deve ser usada como critério único de confirmação da presença de TB no paciente;
- e) “A clínica é soberana”;
- f) Confirmação da TB através da STNPCR é melhor quando há mais de um tipo de amostra clínica do mesmo paciente;
- g) Diagnóstico diferencial nos casos mais difíceis (paucibacilares c/baciloscopia e cultura negativas ou inviáveis);
- h) STNPCR não deve ser recomendada como uso na rotina para detecção de novos casos de TB;
- i) Indicação da STNPCR:
 - Exames bacteriológicos negativos, ou quando apenas o diagnóstico clínico e laboratorial convencionais não forem suficientes para confirmação;
 - Principalmente nas suspeitas de TB extrapulmonar - utilizando sangue separado e urina;
 - Em casos de grande risco ao paciente, onde o tempo para o diagnóstico e início do tratamento específico sejam fundamentais para o doente.

13 REFERÊNCIAS

1. RIBEIRO, L. **Tisiólogos ilustres**. Rio de Janeiro: Sul Americana, 1955.
2. SALO, W. L. et al. **Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in pre-Columbian Peruvian mummy**. Proc Natl Acad Sci USA, Washington, DC, v. 91, p. 2091-2094, 1994.
3. CRUBEZY, E. et al. **Identification of Mycobacterium DNA in an Egyptian Pott's disease of 5,400 years old**. C. R. Acad. Sci. III, Paris, v. 321, n. 11, p. 941-51, 1998.
4. HINRICHSEN, S. L. **DIP - Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
5. PICON, P. D.; RIZZON, C. F. C.; OTT, W. P. **Tuberculose: Epidemia, diagnóstico e tratamento em clínica e Saúde pública**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1993.
6. MARCH, M. F. B. P. **Tuberculose: histórico**. Apud: SANTA'ANNA, C.C. **Tuberculose na infância e na adolescência**. São Paulo: Atheneu, 2002.
7. DUCATI, R. G. et al. **The resumption of consumption: a review on tuberculosis**. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.
8. RIBEIRO, L. **Medicina no Brasil Colonial**. Rio de Janeiro: Sul Americana, 1971.
9. RUFFINO-NETTO, A. **Impacto da reforma do Setor Saúde sobre os serviços de tuberculose no Brasil**. Bol. Pneumol. Sanit., Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 7-18, 1999.
10. TUBERCULOSE. In: WIKIMEDIA FOUNDATION. **Wikipedia**. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Tuberculose&oldid=14004534>>. Acesso em: 30 jan 2009.
11. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Report 2009 Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing**. Geneva, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/full_report.pdf>. Acesso em: 15 maio 2009.
12. INSTITUTO DO MILÊNIO REDE TB. **Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose. Relatório das atividades de pesquisa 2002-2004**. 1. ed. São Paulo, 2005.
13. LEROY, V.; SALMI, L. R.; DUPON, M. **Progression of human immunodeficiency virus infection in patients with tuberculosis disease**. A cohort study in Bordeaux, France 1988-1994. Am. J. Epidemiol., Oxford, v.145, n. 4, p. 193-200, 1997.

-
14. BRASIL. Departamento de Informática do SUS. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação** – **SINAN, 2006.** Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php?name=Tnet>>. Acesso em: 22 out 2007.
15. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global Health Atlas.** Disponível em: <<http://www.who.int/globalatlas/dataQuery/reportData.asp?rptType=1>>. Acesso em: 20 maio 2008.
16. BRASIL. Departamento de Informática do SUS. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação** – **SINAN, 2008.** Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/d0202.def>>. Acesso em: 15 maio 2008.
17. BRASIL. Departamento de Informática do SUS. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação** – **SINAN, 2008.** Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php?name=Tnet>>. Acesso em: 15 maio 2009.
18. BRASIL. Departamento de Informática do SUS. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação** – **SINAN, 2008.** Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinanet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def>>. Acesso em: 28 jun 2009.
19. BRASIL. Departamento de Informática do SUS. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação** – **SINAN, 2008.** Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/c17.def>>. Acesso em: 18 out 2007.
20. BRASIL, Departamento de Informática do SUS. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação** – **SINAN, 2006.** Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/d0202.def>>. Acesso em: 18 out 2007.
21. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
22. PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007.** São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.tuberculosis textbook.com/>>. Acesso em: 28 jun 2009.
23. KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico Microbiológico.** 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.
24. DATTA, M.; SWAMINATHAN, S. **Global aspects of tuberculosis in children.** Paediatr. Respir. Rev., Londres, v. 2, n. 2, p. 91-96, 2001.
25. CABRAL, M. M. L. **Análise de Métodos Diagnósticos da Tuberculose Infantil:** Sistemas de Pontuação do Ministério da Saúde do Brasil, Keith Edwards e uma Abordagem Molecular Baseada na Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase. 2007. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2007.

-
26. BRASIL. Ministério da Saúde. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 2. ed. Brasília, DF, 1989.
27. ABADCO, D. L.; STEINER, P. **Gastric lavage is better than bronchoalveolar lavage for isolation of *Mycobacterium tuberculosis* in childhood pulmonary tuberculosis**. *Pediatr Infect Dis.*, Baltimore, v. 11, n. 9, p. 735-738, 1992.
28. SNIDER Jr., D. E. et al. **Tuberculosis in children**. *Pediatr Infect Dis J.*, Dallas, v. 7, n. 4, p. 271-278, 1988.
29. AMERICAN THORACIC SOCIETY. **Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in adults and children**. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Nova York, v. 161, p. 1376-1395, 2000.
30. FOURIE, P. B. et al. **Procedures for developing a simple scoring method based on unsophisticated criteria for screening children for tuberculosis**. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, Paris, v. 2, n. 2, p. 116-123, 1998.
31. OPLUSTIL, C. P. et al. **Procedimentos básicos em Microbiologia Clínica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 2004.
32. DROBNIEWSKI, F. A. et al. **Modern laboratory diagnosis of Tuberculosis**. *Lancet Infect. Dis.*, Nova York, v. 3, n. 3, p. 141-147, 2003.
33. EISENSTEIN, B. I. **The Polymerase Chain Reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis**. *New Engl. J. Med.*, Boston, v. 322, n. 3, p.178-183, 1993.
34. MELO, F.L. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em PCR para a detecção de *Schistosoma mansoni***. 2006. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife, 2006.
35. ABATH, F. G. C.; WERKHAUSER, R.; MELO, F. L. **Single-tube nested PCR using immobilized internal primers**. *Biotechniques*, Natick, v. 33, n. 6, p. 1210-1214, 2002.
36. MONTENEGRO, L. M. et al. **Development of a single tube hemi-nested PCR for genus-specific detection of Plasmodium in oligoparasitemic patients**. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, Londres, v. 98, n. 10, p. 619-625, 2004.
37. NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. **PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase**. *Rev. Biotecnolog. Cienc. Desenvolv.*, Brasília, DF, n. 33, p. 10-13, 2004. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>>. Acesso em: 17 maio 2008.
38. RUPPENTHAL, R. D. **Aplicações da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico clínico**. 1999. Monografia (Conclusão de curso de graduação em Farmácia) –

Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/pesquisa/biomol/mon_rdr.pdf>. Acesso em: 17 maio 2008.

39. SCHINDLER, H. C. et al. **Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 65, n. 4, p. 355-361, 2001.
40. NOLTE, F.S. et al. **Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis in Sputum by Polymerase Chain Reaction and DNA Hybridization.** *J. Clin. Microbiol.*, Washington, DC, v. 31, n. 7, p. 1777-1782, 1993.
41. BROCCOLO, F. et al. **Rapid diagnosis of Mycobacterial infections and quantification of Mycobacterium tuberculosis load by two Real-time calibrated PCR assays.** *J. Clin. Microbiol.*, Washington, DC, v. 41, n. 10, p. 4565-4572, 2003.
42. ALDOUS, W. K. et al. **Comparison of Six Methods of Extracting Mycobacterium tuberculosis DNA from Processed Sputum for Testing by Quantitative Real-Time PCR.** *J. Clin. Microbio.*, Washington, DC, v. 43, n. 5, p. 2471-2473, 2005.
43. REBOLLO, M. et al. **Blood and urine samples as useful sources for direct detection of tuberculosis by polymerase chain reaction.** *Diag. Microbiol. infect. Dis.*, Wiesbaden, v. 56, n. 2, p. 141-146, 2006.
44. CANNAS, A. et al. **Mycobacterium tuberculosis DNA detection in soluble fraction of urine from pulmonary tuberculosis patients.** *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, Paris, v. 12, n. 2, p. 146-151, 2008.
45. LUCENA, W. A. et al. **Diagnosis of Wuchereria bancrofti infection by the polymerase chain reaction using urine and day blood samples from amicrofilaraemic patients.** *Trans. Roy. S. Trop. Med. Hyg.*, Londres, v. 92, n. 3, p. 290-293, 1998.
46. LEAL, N. C. et al. **A simple PCR-based procedure for plague diagnosis.** *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 371-373, 1996.
47. ASSIS, N. C. S. et al. **Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar.** *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2007.
48. FORSLUND, O.; LY, H.; HIGGINS, G. **Improved detection of cutaneous human papillomavirus DNA by single tube nested "hanging droplet" PCR.** *J. Virol. Methods*, Amsterdam, v. 110, n. 2, p.129-136, 2003.
49. YUEN, K. Y., et al. **Comparison of two automated DNA amplification systems with a manual one-tube Nested PCR assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis.** *J. Clin. Microbiol.*, Washington, DC, v. 32, n. 6, p. 1382-1389, 1997.

-
50. HERMANS, P. W. M. **Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis***: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, DC, v. 28, n. 9, p. 2051-2058, 1990.
51. VAN SOOLINGEN, D. et al. **Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains**: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, DC, v. 29, n. 11, p. 2578-2586, 1991.
52. HELLYER, T. J., et al. **IS6110 homologs are present in multiple copies in *Mycobacteria* other than tuberculosis-causing *Mycobacteria***. *J. Clin. Microbiol.*, Washington DC, 1998, v. 36, n. 3, p. 853-854.
53. KRITSKI, A. L. **Avaliação da reação em cadeia da polimerase no diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes indígenas e não indígenas**. *J. Bras. Pneumol.*, São Paulo, 2006, v. 32, n. 3, p. xiii-xiv.
54. CAVE, D. M. et al. **IS6110**: Conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol. Cel. Probes*, Londres, v. 5, n. 1, p. 73-80, 1990.
55. BRASIL. **Boletim Eletrônico Epidemiológico do Ministério da Saúde**. FUNASA. Brasília, DF, n. 1, ano 2, 2002. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=28113>. Acesso em: 22 out 2007.
56. BRASIL. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para o controle da tuberculose**: cadernos de atenção básica. 6. ed. rev. e ampl., Brasília, DF, 2002.
57. BASS Jr., J. B. et al. **Diagnostic standards and classification of tuberculosis**. *Am. Rev. Respir. Dis.*, Baltimore, v. 142, n. 3, p. 725-735, 1990.
58. BRASIL. Ministério da Saúde. **Tuberculose**. In: _____ **Guia de Vigilância Epidemiológica**. FUNASA. Brasília, DF, 2002. Cap. 1, pág. 11.
59. ANDRADE, L. M. et al. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**, 1. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 1980.
60. BARRETO, A. M. W.; CAMPOS, C. E. D.; MARTINS, F. M. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**, 2. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 1994.
61. BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2005.

-
62. ROSSETTI, M. L. R. et al. **Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix.** J. Microbiol. Methods, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 139-146, 1997.
63. RITIS, K. et al. **Amplification of IS6110 sequence for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in HIV-negative patients with fever of unknown origin (FUO) and evidence of extrapulmonary disease.** J. Intern. Med., Oxford, v. 248, n. 5, p. 415-424, 2000.
64. MEDRONHO, R. A. et al. **Epidemiologia.** São Paulo: Ed. Atheneu, 2002.
65. RUFFINO-NETTO, A. **Programa de Controle da Tuberculose no Brasil: Situação Atual e Novas Perspectivas.** Infor. Epidemiol. SUS, Brasília, DF, v. 10, n. 3, p. 129-138, 2001.
66. RUFFINO-NETTO, A. **Brasil: doenças emergentes ou reemergentes?** Rev. Med. Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 405, 1997.
67. CAMPOS, H. S. **Diagnóstico da tuberculose.** Pulmão RJ, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 92-99, 2006.
68. BOLLELA, V. R.; SATO, D. N.; FONSECA, B. A. L. **Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico de tuberculose pulmonar.** Rev. Saude Publica, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 281-286, 1999.
69. BUTT, T. et al. **An update on the diagnosis of tuberculosis.** J. Coll. Physicians Surg. Pak., Karachi, v. 13, n. 12, p. 728-734, 2003.
70. ABATH, F. G. C., WERKHAUSER, R. P.; MELO, F. L. **Método, kit e iniciadores para a identificação de seqüências específicas de nucleotídeos através da reação em cadeia da polimerase tipo Nested em um único tubo de reação.** BR n. PI 015740-5, 29 nov 2001.
71. MAGANA-ARACHCHI, D. et al. **Low cost in-house PCR for the routine diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis.** Int. J. Tuberc. Lung Dis., Paris, v. 12, n. 3, p. 275-280, 2008.
72. KOX, L. F. F. et al. **A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples.** J. Clin. Microbiol., Washington, DC, v. 32, n. 3, p.672-678, 1994.
73. PORTILLO-GÓMEZ, L.; MORRIS, S. L.; PANDURO, A. **Rapid and efficient detection of extrapulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis.** Int. J. Tuberc. Lung Dis., Paris, v. 4, n. 4, p.361-370, 2000.
74. RIBHI, M. et al. **Detection of *M. Tuberculosis* in clinical samples by two-step Polymerase Chain reaction and nonisotopic hybridization Methods.** J. Clin. Microbiol., Washington, DC, v. 31, n. 1, p.61-65, 1993.

-
75. KRITSKI, A. L.; CASTELO, A.; MELLO, F. C. Q. **Reação em cadeia da polimerase (RCP/PCR) aplicada ao diagnóstico de tuberculose.** J. Pneumol., Brasília, DF, v. 23, n. 1, p. 33-42, 1997.
76. AL-SOUD, W. A.; RÂDSTRÖM, P. **Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells.** J. Clin. Microbiol., Washington, DC, v. 39, n. 2, p. 485-493, 2001.
77. NOORDHOEK, G. T. et al. **Sensitivity and Specificity of PCR for Detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a Blind Comparison Study among Seven Laboratories.** J. Clin. Microbiomol., Washington, DC, v. 32, n. 2, p. 277-284, 1994.
78. FOLGUEIRA, L. et al. **Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculous meningitis in AIDS patients.** Neurology, Minneapolis, v. 44, p.1336-1338, 1994.
79. LEE, B. W. et al. **DNA amplification by polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculous meningitis.** Comparison of protocols involving three mycobacterial DNA sequences, IS6110, 65kDa antigen, and MPB64. J. Neurol. Sci., Amsterdam, v. 123, n. 1-2, p. 173-179, 1994.
80. AN, S. F.; FLEMING, K. A. **Removal of inhibitors of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin-wax embedded tissues.** J. Clin. Pathol., Londres, v. 44, p. 924, 1991.
81. BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GUSHIKEN, T. **Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR).** Rev. Bras. Hematol. Hemoter., Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2004.
82. RESTREPO, B. I. et al. **Selective enrichment and detection of mycobacterial DNA in paucibacillary specimens.** J. Microbiol. Methods, Amsterdam, v. 67, n. 2, p. 220-229, 2006.
83. SANCHEZ-ALBISUA, I. et al. **Twenty years of pulmonary tuberculosis in children: what has changed?** Pediatr. Infect. Dis. J., Baltimore, v. 21, n. 1, p. 49-53, 2002.
84. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Notices to Readers Nucleic Acid Amplification Tests for Tuberculosis.** MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep., Atlanta, v. 45, n. 43, p.950-952, 1996.
85. MELLO, L. C. Q. **Modelos preditivos para o diagnóstico da tuberculose pulmonar paucibacilar.** Tese (Doutorado em Clínica Médica). Rio de Janeiro (RJ): Faculdade de Medicina da UFRJ; 2001.
86. LIMA, J. F. C. et al. **Avaliação do desempenho da técnica de "Nested-PCR" na detecção específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos.** J. Pneumol., Brasília, DF, v.35, n. 7, 2009. No Prelo.

-
87. KHAN, M. A. et al. **Peripheral blood-based Polymerase Chain Reaction in diagnosis of pulmonary tuberculosis.** J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad, Abbottabad, v.18, n. 2, p.25-28, 2006.
88. HAJIABDOLBAGHI, M. et al. **Peripheral blood mononuclear cell *Mycobacterium tuberculosis* PCR sensitivity in diagnosis of tuberculosis.** Tehr. Univ. Med. J., Tehran, v. 65, n. 11, p. 6-12, 2008.
89. LIMA, A. J. A. et al. **Diagnóstico laboratorial das micobactérias isoladas na urina: comparação entre métodos convencionais e a reação em cadeia da polimerase (PCR).** Rev. Bras. Anal. Clin., Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 141-145, 2006.
90. KRISHNAMOORTHY, G.; SINGH, S. **Urine as an adjunct specimen for the diagnosis or active pulmonary tuberculosis.** Int. J. Infect. Dis., Hamilton, v. 13, n. 3, p. 374-379, 2008.
91. KAFWABULULA, M. et al. **Evaluation of PCR-based methods for the diagnosis of tuberculosis by identification of mycobacterial DNA in urine samples.** Int. J. Tuberc. Lung. Dis., Paris, v. 6, n. 8, p. 732-737, 2002.
92. COUTO-SANT'ANNA, C.; SANTOS, M. A. R. C.; FRANCO, R. **Diagnosis of pulmonary tuberculosis by score system in children and adolescents: a trial in Reference center in Bahia, Brazil.** Braz. J. Infect. Dis., Salvador, v. 8, n. 4, p. 305-310, 2004.
93. MYEONG-HEE, K. et al. **Comparison of In-house PCR with conventional techniques and Cobas Amplicor *M. tuberculosis*TM kit for detection of *Mycobacterium tuberculosis*.** Yonsei Med. J., Seoul, v. 49, n. 4, p. 537-544, 2008.
94. CHENG, V. C. C. et al. **Clinical evaluation of the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculosis.** J. Clin. Pathol., Londres, v. 57, p. 281-285, 2004.
95. MORÁN, M. M. et al. **Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del noroccidente de México.** Rev. Panam. Salud. Publica, Washington, DC, v.7, p.389-394, 2000.
96. NEWTON, S. M. et al. **Pediatric tuberculosis.** Lancet Infect. Dis., Nova York, v. 8, n. 8, p. 498-510, 2008.
97. CHARNACE, G.; DELACOURT, C. **Diagnostic techniques in pediatric tuberculosis.** Paediatr. Respir. Rev., Londres, v. 2, n. 2, p. 120-125, 2001.
98. MELO, F. A. F.; AFIUNE, B. J.; MACEDO, L. G. **Características da Tuberculose pulmonar num serviço de referência antes e após a implantação do Sistema único de Saúde.** J. Pneumol., Brasília, DF, v.18, suppl, p.122, 1992.

99. BRASIL. **Diagnóstico da tuberculose**. In _____ : II Consenso Brasileiro de Tuberculose. Diretrizes Brasileiras para tuberculose 2004. J. Bras. Pneumol., Brasília, DF, v.30, n. 1, p. 6-23, 2004.

APÊNDICE A

Artigo original: *Jornal Brasileiro de Pneumologia* - Vol. 35 / Ed. 7 / Julho de 2009 / p. 690-697.

Desempenho da técnica Nested-PCR na detecção específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos.

Autores: Juliana Figueirêdo da Costa Lima, Lílian Maria Lapa Montenegro, Rosana de Albuquerque Montenegro, Marta Maciel Lyra Cabral, Andrea Santos Lima, Frederico Guilherme Coutinho Abath (in memoriam), Haiana Charifker Schindler.

Resumo:

Objetivo: Avaliar o desempenho da técnica nested PCR (nPCR) para detectar o complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de sangue de pacientes com suspeita de TB para sua possível utilização como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico laboratorial da doença em crianças. **Métodos:** Detecção do complexo *M. tuberculosis* em amostras de sangue usando como alvo a sequência de inserção IS6110 do DNA genômico do bacilo. Foram avaliados 120 pacientes, menores de 15 anos de idade, de ambos os sexos, provenientes de hospitais públicos do Recife (PE), no período entre janeiro de 2003 e agosto de 2005. O diagnóstico de TB foi realizado pelo médico assistente do serviço de saúde de acordo com os critérios da Sociedade Torácica Americana. A nPCR amplificou um fragmento de 123 pb com oligonucleotídeos externos (IS1/IS2) e, na reação subsequente, com oligonucleotídeos internos (IS3/IS4), gerando um amplicon de 81 pb. **Resultados:** A TB ativa ou latente esteve presente em 65 pacientes, foi descartada em 28 suspeitos e 27 não tinham a doença (controles). A sensibilidade da nPCR foi de 26,15%, sendo significativamente maior na forma extrapulmonar (55,56%) em relação à pulmonar (18,18%), e a especificidade foi de 92,73%. **Conclusões:** Diante das dificuldades diagnósticas da TB infantil e do baixo número de casos estudados, a nPCR em sangue demonstrou ser uma técnica rápida e específica, mas com baixa sensibilidade. Para saber a sua real utilidade no diagnóstico de formas paucibacilares, sobretudo as extrapulmonares, novas pesquisas devem ser desenvolvidas com uma casuística maior de crianças e com outros espécimes biológicos além do sangue.

Palavras-chave: Tuberculose; Diagnóstico; Sangue; Reação em cadeia da polimerase.

Abstract:

Objective: To evaluate the performance of nested PCR (nPCR) in detecting the *Mycobacterium tuberculosis* complex in blood samples of patients suspected of having TB, in order to determine its potential for use as an auxiliary tool in the laboratory diagnosis of TB in children. **Methods:** Detection of the *M. tuberculosis* complex in blood samples using as a target the insertion sequence IS6110 of the genomic DNA of

the bacillus. Blood samples of 120 patients were evaluated. All of the patients were under 15 years of age at the time of their treatment at public hospitals in the city of Recife, Brazil (between January of 2003 and August of 2005). Attending physicians at the hospitals diagnosed TB based on the criteria recommended by the American Thoracic Society. The nPCR amplified a 123-bp fragment with outer oligonucleotides (IS1/IS2) and, in the subsequent reaction, using inner oligonucleotides (IS3/IS4), generating an 81-bp amplicon. Results: Active or latent TB was found in 65 patients, TB was ruled out in 28 suspected cases, and 27 patients were TB-free (controls). The sensitivity of nPCR was 26.15% and was significantly higher for the extrapulmonary form of the disease (55.56%) than for the pulmonary form (18.18%). The specificity was 92.73%. Conclusions: Despite the difficulties in diagnosing TB in children and the low number of cases evaluated in the present study, nPCR in blood samples proved to be a rapid and specific technique, albeit one with low sensitivity. In order to establish its true usefulness in the diagnosis of paucibacillary forms, especially extrapulmonary TB, further studies need to be carried out with a larger sample of children and analyzing biological specimens other than blood.

Keywords: Tuberculosis; Diagnosis; Blood; Polymerase chain reaction.

Introdução

Estima-se que existam cerca de 42 milhões de pessoas infectadas por TB no Brasil, e 10% dos casos notificados por ano ocorrem em menores de 15 anos.(1) Em Pernambuco, no ano de 2006, foram notificados 184 casos novos de TB infantil (0-14 anos), sendo 74,46% deles na forma pulmonar.(2) Os dados sobre TB infantil (geralmente paucibacilar) são escassos na literatura, sobretudo pela grande dificuldade em realizar-se o diagnóstico, pois raramente há confirmação bacteriológica. Essa dificuldade está relacionada à falta de um quadro clínico específico, à ausência de imagens radiológicas pulmonares patognomônicas da doença, à baixa sensibilidade da bacterioscopia e ao fato de que a reatividade do teste tuberculínico de Mantoux fica prejudicada pela vacinação recente com BCG.(3) Nessa faixa etária, a obtenção do escarro para pesquisa do *Mycobacterium tuberculosis* é restrita, devido à dificuldade de expectoração, sobretudo em menores de 5 anos. O achado de *M. tuberculosis* através da bacilosscopia ou cultura é o padrão ouro para a confirmação da doença, mas requer entre 3 e 8 semanas para o resultado,(4) e o tempo necessário para a identificação do bacilo de Koch é muito importante para o início precoce da terapêutica específica.(5) Em crianças, além da demora, as múltiplas culturas apresentam positividade em menos de 20% dos suspeitos de TB primária.(6) O complexo *M. tuberculosis* é bastante infeccioso; portanto, é fundamental o rápido diagnóstico para evitar a disseminação da doença, principalmente em grupos de maior risco.

Com a biologia molecular, novas ferramentas têm surgido para auxiliar o diagnóstico de várias enfermidades infectocontagiosas. A PCR é um método sensível para a detecção de DNA de micobactérias diretamente de espécimes clínicas. Permite a síntese enzimática in vitro de sequências específicas do genoma através de dois iniciadores que hibridizam fitas opostas de DNA. Numerosos ensaios de PCR, utilizando sequências conservadas de DNA como alvo de amplificação, têm sido descritos para a detecção do complexo *M. tuberculosis* em espécimes clínicas de adultos,(7,8) demonstrando sua utilidade para o diagnóstico precoce.(9,10)

Uma variação da PCR, conhecida como nested PCR (nPCR), utiliza dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores em reações subsequentes, cujo produto de amplificação da primeira reação é utilizado como molde para a segunda. Essa técnica é proposta para a detecção do *M. tuberculosis* nos casos que necessitam de alta especificidade e sensibilidade.(9,11) O propósito da pesquisa foi avaliar o desempenho da nPCR em amostras sanguíneas de crianças paucibacilíferas e sua aplicabilidade clínica como ferramenta diagnóstica para a TB infantil.

Métodos

Estudo prospectivo, com pacientes de ambos os sexos, menores de 15 anos de idade, com suspeita inicial de TB e atendidos nos ambulatórios ou enfermarias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, do Hospital Barão de Lucena e do Instituto de Medicina Integral Fernando Figueira entre janeiro de 2003 e agosto de 2005. O diagnóstico de TB foi realizado, de acordo com os critérios da Sociedade Torácica Americana,(12) pelo médico assistente do serviço de saúde de modo duplo cego. Foram considerados como padrão ouro os métodos convencionais de rotina baseados em critérios epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (teste tuberculínico de Mantoux e radiografia de tórax), também tendo como base a evolução e a resposta terapêutica específica do paciente. O teste tuberculínico de Mantoux foi realizado segundo as normas do Ministério da Saúde do Brasil.(13) Todos os pacientes com definição diagnóstica de TB ativa ou latente foram acompanhados e tratados nos serviços de saúde participantes da pesquisa, que são especializados em TB infantil. Os grupos foram classificados da seguinte maneira:

- 1) Suspeita de TB: evidência clínica ou radiológica, história de contato com adulto tuberculoso ou prova tuberculínica positiva (≥ 10 mm em vacinados com BCG há mais de 2 anos e > 15 mm em vacinados há menos de 2 anos)(13):

- a) TB ativa: evidência clínica ou radiológica compatível com TB ativa, isolamento do *M. tuberculosis* em amostra biológica ou melhora clínica após tratamento específico.

- b) TB latente: sem manifestações clínicas nem radiológicas da doença; exames bacteriológicos (quando possível) negativos; teste tuberculínico positivo(13) e história de contato com adulto bacilífero.

- c) Descartada: história de contato com adulto tuberculoso, ausência de sintomas ou alterações sugestivas de TB e teste tuberculínico negativo.

- 2) Sem TB (controle): ausência de contato com adulto tuberculoso, quadro clínico e laboratorial não compatível com TB latente ou ativa; presença de cicatriz vacinal de BCG.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, Recife (PE). Os responsáveis pelos menores assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido referente à participação na pesquisa e à coleta do sangue. As informações clínicas e epidemiológicas de cada paciente foram registradas numa ficha pré-elaborada por um dos pesquisadores e inseridas em um banco de dados para as análises estatísticas.

Foram excluídos indivíduos portadores de doenças crônicas; em uso de corticosteroides ou drogas imunossupressoras por mais de 15 dias; indivíduos sabidamente portadores de HIV e portadores de outras pneumopatias crônicas.

Para haver uma padronização e resultados mais eficazes, utilizou-se o DNA genômico purificado de cepa de referência (H37Rv) do *M. tuberculosis*, utilizando-se o kit de extração (Tissue and Cells GenomicPrep; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), segundo as instruções do fabricante. Para determinar o limiar de detecção através da nPCR, foi realizada uma curva de diluição de fator 10 seriada, variando de 10 ng a 0,01 fg. Posteriormente, adicionou-se DNA purificado ao sangue de indivíduo sadio. O DNA desta cepa foi utilizado como controle positivo nas reações de amplificação.

Foram coletados 2-4,5 mL de sangue de cada paciente por punção venosa usando tubos (Vacutainer; Becton and Dickson, Oxford, Inglaterra), contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e acondicionados a 4°C.

A extração de DNA foi realizada da seguinte forma: uma alíquota de 500 µL da amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 min e submetida a três lavagens com tampão Tris-EDTA (TE). O sedimento foi ressuscitado em 100 µL de TE e aquecido em termobloco a 100°C por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionou-se 5 µL de resina (Sephaglas BandPrep Kit; Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) e, ao volume final, o dobro desse volume com uma solução de iodeto de sódio (0,9 g/mL). Em seguida, o tubo foi agitado por 5 min e incubado à temperatura ambiente por mais 5 min. Os tubos foram centrifugados por 1 min, descartando-se o sobrenadante e adicionando-se 200 µL de etanol gelado a 70%, seguida por nova agitação e centrifugação por 1 min. O sedimento foi deixado à temperatura ambiente durante 60 min para secagem completa e ressuscitado com 40 µL de TE, sendo incubado em banho-maria a 50°C por 10 min. Centrifugado por 1 min, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo e estocado a -20°C até o uso para PCR.(14) A sequência de inserção IS6110, encontrada em cepas do complexo *M. tuberculosis*, foi o alvo utilizado para a amplificação.(15)

O DNA do *M. tuberculosis* existente nas amostras biológicas foi amplificado em um termociclador automático (modelo 4800; Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA). A mistura da primeira reação de amplificação consistiu de KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP (200 µM cada), 25 pmol de cada oligonucleotídeo (IS1-5'CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG3' e IS2-5'CTCGTCCAGCGCCGCTTTCGG3')(16) e 2,5 U de Taq DNA polimerase, num volume final de 50 µL. A fase de desnaturação aconteceu a 94°C por 30 s; a fase de anelamento, a 68°C por 1 min; e a fase de extensão, a 72°C por 1 min, totalizando 30 ciclos. Na segunda reação (nPCR), foram adicionados 2 µL do produto da primeira reação, nas mesmas concentrações que a anterior. As condições de amplificação, nas fases descritas acima, foram, respectivamente, 94°C por 30 s, 57°C por 30 s, e 72°C por 30 s, utilizando-se os oligonucleotídeos IS3 e IS4 (5'GGTGACAAAGGCCACGTAGG3' e 5'CCAGCACCTAACCGGCTGT3', respectivamente)(16) por 30 ciclos.

Dos produtos amplificados, 10 µL foram analisados em gel de agarose a 2,0% e corados com brometo de etídio. As bandas de DNA separadas por eletroforese foram visualizadas em um transluminador com luz UV e fotografados com uma câmera (Polaroid MP4+ Instant Camera System; Polaroid, Minnetonka, MN, EUA). Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos, e a apresentação

das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas. Para a análise das variáveis, foi aplicado o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher quando necessário. Para a validação dos testes, foram calculados a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo com seus respectivos intervalos de confiança. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os programas utilizados foram Epi Info versão 6.04d e Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) versão 8.0.

Resultados

Os resultados mostraram a amplificação específica do DNA genômico de *M. tuberculosis*, não havendo amplificação aleatória do genoma humano. Na primeira reação, foi produzido um amplicon de 123 pb e na segunda, um de 81pb (dados não mostrados). A quantidade mínima detectada utilizando DNA genômico purificado de *M. tuberculosis* e DNA genômico purificado adicionado ao sangue de doador sadio foi de 0,1 fg e 100 fg, respectivamente (Figura 1).

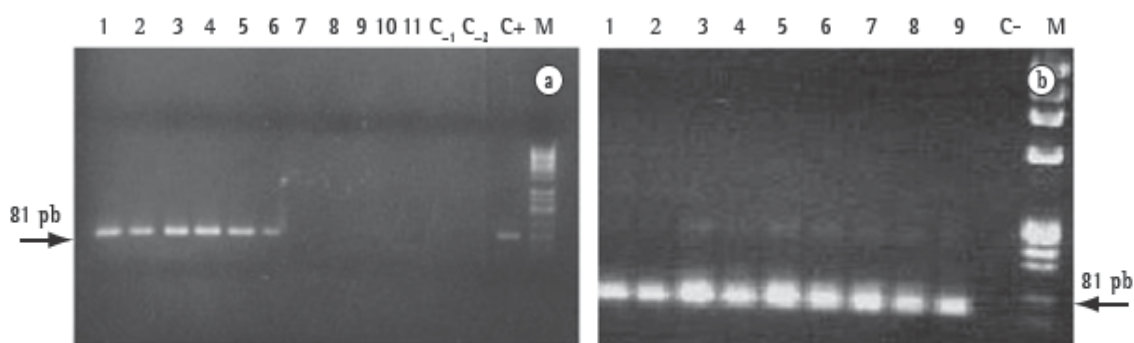


Figura 1 - Em a), curva de diluição utilizando sangue total de um indivíduo sadio misturado com DNA de *Mycobacterium tuberculosis*. Em b), curva de diluição de DNA de *M. tuberculosis* em água para estabelecer o limite de detecção de DNA através da *nested* PCR.

No estudo, foram avaliados 120 pacientes, sendo 93 com suspeita clínica inicial da doença e 27 indivíduos controles. A mediana da idade foi de $7,00 \pm 0,42$ anos. Não houve diferença significativa em relação ao sexo dos indivíduos. De acordo com o diagnóstico final, os indivíduos foram categorizados da seguinte maneira: TB ativa, TB latente, TB descartada e controle (indivíduos não-infectados; Tabela 1).

Tabela 1 – Características clínicas e demográficas dos pacientes estudados.

Características	n	%
Idade		
≤ 5 anos	48	39,7
> 5 anos	72	60,2
Procedência		
Ambulatório	105	87,5
Enfermaria	15	12,5
Sexo		
Masculino	61	50,5
Feminino	59	49,5
Diagnóstico final		
TB ativa	42	35,0
TB latente	23	19,2
Controles*	55	45,8
Forma clínica		
TB pulmonar	33	79,0
TB extrapulmonar	9	21,0

*TB descartada + sem TB.

Dentre os 93 indivíduos que apresentaram suspeita inicial, a maioria dos casos diagnosticados (69,89%) foi de TB ativa ou TB latente. No grupo de pacientes doentes, a forma prevalente foi a pulmonar (78,57%). As formas de TB extrapulmonar detectadas foram: ganglionar periférica (n = 3), óssea (n = 2), abdominal (n = 1), pleural (n = 1), miliar (n = 1) e meningite (n = 1). Não houve diferença significativa entre a faixa etária e a presença da doença ou as formas clínicas.

Nesse mesmo grupo de suspeitos, a nPCR foi positiva em 22,58%. A taxa de concordância entre o diagnóstico final dos pacientes e a nPCR foi de 52,38% dos casos com TB ativa e de 28,57% dos casos de TB latente. Em 19,05% dos pacientes cuja TB foi descartada pelo médico, a nPCR foi positiva (Tabela 2).

Tabela 2 – Desempenho da *nested* PCR nos pacientes com TB ativa, TB latente e controles.

<i>Nested</i> PCR	TB ativa	Controles	TB latente	Controles
Resultado				
Positivo, n (%)	11 (26,2)	4 (7,3)	6 (26,1)	4 (7,3)
Negativo, n (%)	31 (73,8)	51 (92,7)	17 (73,9)	51 (92,7)
Sensibilidade, % (IC95%)	26,2 (14,4-42,3)		26,1 (11,1-48,7)	
Especificidade, % (IC95%)	92,7 (81,6-97,6)		92,7 (81,6-97,6)	
Valor preditivo positivo, % (IC95%)	73,3 (44,8-91,1)		60 (27,4-86,3)	
Valor preditivo negativo, % (IC95%)	62,2 (50,8-72,5)		75 (62,8-84,4)	
P		0,1		0,033

No estudo, foram avaliados 120 pacientes, sendo 93 com suspeita clínica inicial da doença e 27 indivíduos controles. A mediana da idade foi de 7,00 ± 0,42 anos. Não

houve diferença significativa em relação ao sexo dos indivíduos. De acordo com o diagnóstico final, os indivíduos foram categorizados da seguinte maneira: TB ativa, TB latente, TB descartada e controle (indivíduos não-infectados; Tabela 1).

Para a avaliação do real desempenho da nPCR, considerando a limitação do padrão ouro inerente à confirmação da doença na faixa pediátrica, foi incluído no grupo controle também o grupo de pacientes em que a TB foi descartada apesar de serem considerados inicialmente suspeitos. A sensibilidade da nPCR obtida foi de 26,15%, e a especificidade foi de 92,73%. Considerando a forma da doença, a sensibilidade para a TB extrapulmonar foi de 55,56% e, para a TB pulmonar, 18,18% (Tabela 3).

Tabela 3 - Desempenho da *nested* PCR nos pacientes com TB pulmonar, TB extrapulmonar e controles.

<i>Nested</i> PCR	TB pulmonar	Controles	TB extrapulmonar	Controles
Resultado				
Positivo, n (%)	6 (18,2)	4 (7,3)	5 (55,6)	4 (7,8)
Negativo, n (%)	27 (81,8)	51 (92,7)	4 (44,4)	51 (92,2)
Sensibilidade, % (IC95%)	18,2 (7,6-36,1)		55,6 (22,7-84,7)	
Especificidade, % (IC95%)	92,7 (81,6-97,6)		92,7 (81,6-97,6)	
Valor preditivo positivo, % (IC95%)	60,0 (27,4-86,3)		55,6 (22,7-84,7)	
Valor preditivo negativo, % (IC95%)	65,4 (53,7-75,6)		92,7 (81,6-97,6)	
p		0,114		0,002

Discussão

A TB infantil é um sinalizador da qualidade do sistema de saúde, sendo indicativa de que os casos bacilíferos em adultos não estão sendo detectados precocemente, permitindo a disseminação da doença. Um terço dos contatos adultos com TB ativa tem seu diagnóstico definido após a confirmação da doença na criança. Isso demonstra que um número considerável de adultos pode ficar sintomático durante um período prolongado e infectar outros grupos, além do pediátrico, levando ao desenvolvimento da doença.(17) Devido à dificuldade confirmatória da TB infantil através de exames bacteriológicos, a implantação da PCR como ferramenta auxiliar na detecção da doença, sobretudo em casos difíceis ou paucibacilares, poderá possibilitar o uso de amostras biológicas menos traumáticas e que podem ser coletadas ambulatorialmente quando comparadas com o lavado gástrico, que necessita de internação e sedação.

As características clínicas e demográficas dos indivíduos da pesquisa são muito semelhantes às dos demais estudos avaliados.(3,18) Possivelmente as variações em relação ao sexo e à mediana de idade são devidas ao número diferente de pacientes incluídos. As faixas etárias mais baixas não estiveram diretamente relacionadas às formas extrapulmonares,(19) provavelmente pelo maior número de crianças concentradas na faixa etária ≥ 5 anos, na qual o diagnóstico de TB parece ser mais evidente.

Na análise do desempenho da nPCR para amplificação do alvo IS6110, o limite mínimo de detecção de DNA genômico do bacilo foi equivalente a menos DNA do que o contido em uma micobactéria (5 fg).(5) A sensibilidade de detecção foi mais eficiente que em outros trabalhos, já descritos na literatura, utilizando o mesmo sistema.(19,20)

A maioria dos pacientes com suspeita inicial de TB foi diagnosticada como caso (ativa ou latente) provavelmente por eles serem provenientes de hospitais ou ambulatórios de referência para TB.

O desempenho de um teste diagnóstico depende da eficiência do padrão ouro em detectar a existência ou não da doença. Dessa forma, testes moleculares baseados em PCR podem apresentar uma baixa sensibilidade devido à limitação do padrão ouro em detectar o *M. tuberculosis* na infância,(18,21) levando-se ao questionamento de muitos pacientes considerados doentes ou infectados incluídos neste estudo, cuja definição foi baseada em critérios clínicos e subjetivos.(19)

A sensibilidade encontrada com a nPCR para o diagnóstico de TB em menores de 15 anos foi baixa, utilizando sangue periférico total; porém, teve uma excelente especificidade. Resultados semelhantes (sensibilidade de 20% e especificidade de 94,44%) foram encontrados por outros autores,(22) que utilizaram PCR em amostras de sangue de adultos, a maioria desses com TB pulmonar. Todavia, 26,7% dos pacientes que iniciam o tratamento específico para TB pulmonar o fazem sem confirmação - bacteriológica. A decisão do tratamento é tomada baseada apenas no quadro clínico e radiológico.(23) Portanto, a nPCR poderia ter um papel relevante nessa parcela de suspeitos que ficariam sem diagnóstico ou que iniciariam o tratamento sem a confirmação da doença.

O desempenho do sistema de PCR mostra ser mais promissor para o diagnóstico de TB em adultos, sobretudo na forma pulmonar, quando se utiliza o escarro como amostra biológica.(24,25) Já o uso da nPCR no sangue é importante para tentar elucidar os casos da doença nas formas extrapulmonares ou paucibacilares, cuja baciloscopia no escarro é negativa ou quando não existe expectoração.

Provavelmente, o inadequado desempenho da nPCR encontrado neste estudo deve-se à imprecisão no diagnóstico clínico da TB infantil, à baixa carga bacilífera desse grupo e à dificuldade na detecção de *M. tuberculosis* nos exames de rotina, além do baixo número de pacientes estudados. A escassez de trabalhos na literatura utilizando o sistema de PCR em espécimes biológicos para o diagnóstico da TB infantil e a presença de inibidores do sangue que interferem na amplificação do DNA também contribuíram para este resultado.

Em relação às formas de TB e os resultados da nPCR, a taxa de positividade do teste na TB extrapulmonar foi significativamente maior que na pulmonar. Esse achado corrobora com o de outros autores,(26) que relataram a existência de uma maior possibilidade dos bacilos circularem no sangue periférico na forma extrapulmonar da doença. Outros autores(20) apontaram para a dificuldade de se encontrar *M. tuberculosis* em espécimes extrapulmonares, onde a quantidade de bacilos é escassa, levando à baixa sensibilidade da baciloscopia e da cultura, assim como para a presença de fatores inibidores que podem interferir na amplificação do DNA através da PCR. No entanto, encontramos uma maior sensibilidade da PCR nas crianças com TB extrapulmonar, mesmo utilizando sangue de pacientes paucibacilíferos. Também devem ser considerados os métodos de extração e o sistema da nPCR utilizados neste trabalho.

Em 4 pacientes cujo diagnóstico clínico não foi compatível com TB, a nPCR foi positiva. Porém, essas crianças apresentaram alguma forma de contato com adulto bacilífero. Em 1 delas, o teste tuberculínico não foi reator, apesar de ter tido contato intradomiciliar por mais de 2 anos com um adulto que fazia tratamento irregular para TB e história de pneumonia anterior. Outra teve o resultado do teste tuberculínico de 9 mm e diagnóstico de pneumonia aguda. A terceira criança, além do contato, apresentou micropoliadenopatia cervical, e a última foi reatora ao teste tuberculínico e tinha contato com tuberculoso por mais de 1 ano. Após ter sido afastada a possibilidade de TB ativa,

essas crianças não retornaram ao serviço de saúde para acompanhamento. Como a PCR pode detectar DNA viável ou inviável do bacilo,(9) esses pacientes poderiam estar na fase inicial da infecção/doença ou terem tido o processo de cura espontânea.

Embora tenham sido adicionados controles negativos em todas as etapas de extração e amplificação do DNA e repetidas as amostras duvidosas, faz-se necessário analisar um maior número de amostras para diminuir a possibilidade de resultados falso-positivos. A amplificação do DNA por PCR tem mostrado ser um método bastante específico e com sensibilidade razoável para detecção do *M. tuberculosis* em sangue total, comparando-se a outros trabalhos.(10,27) Já existe a descrição de testes in house de PCR para TB com desempenho promissor em amostras respiratórias com baciloscopia negativa em adultos,(28) mas os estudos são escassos sobre amostras de sangue de crianças.

Métodos baseados na amplificação de DNA poderão auxiliar o diagnóstico precoce de TB em crianças e indivíduos paucibacilares e reduzir o período de definição da doença para 1-2 dias,(8,9) sobretudo se for possível detectar o DNA do *M. tuberculosis* em sangue, amostra pouco invasiva e viável nessa faixa etária.

A PCR pode ter um papel importante na prática clínica quando o diagnóstico da TB é difícil e precisa de uma definição urgente pela gravidade do paciente,(28) em formas disseminadas e extrapulmonares da doença, sobretudo em indivíduos soropositivos para HIV.(3,25) Diante dos achados, pode-se sugerir a nPCR como método auxiliar na elucidação diagnóstica; no caso de ser positiva, pela baixa sensibilidade demonstrada, não deve ser dissociada dos critérios clínicos, epidemiológicos e/ou laboratoriais de rotina. Apesar de ter apresentado uma especificidade alta, a nPCR não pode ser considerada por si só como método de exclusão no grupo de pacientes pediátricos cuja TB é de natureza paucibacilar. Além disso, o sangue pode conter fatores inibidores para a PCR.(29) O diagnóstico precoce nos menores de 15 anos e a busca por adultos bacilíferos trará uma maior detecção dos casos índices da doença(30) e um impacto positivo nos programas de controle da TB. Devido à imprecisão em identificar crianças infectadas ou doentes, da pouca atenção dada à TB infantil nos programas de governo e da escassez de estudos na literatura sobre técnicas moleculares para a detecção do bacilo de Koch, torna-se fundamental a realização de novas pesquisas em busca de métodos mais sensíveis e específicos, utilizando diversos espécimes biológicos de pacientes com a forma paucibacilar da doença. Diante deste estudo, sugerimos a realização de outras pesquisas moleculares para o diagnóstico, através do sangue, da TB paucibacilar com uma amostra representativa da população para uma melhor avaliação destes resultados.

Agradecimentos

Agradecemos aos médicos Victor Lopes de Melo e Bruno Canto C. de A. Azevedo, à biomédica Joanna d'Arc Lyra Batista, aos profissionais envolvidos e a todos os pacientes e controles.

Referências

1. Souza WV, Albuquerque MF, Barcellos CC, Ximenes RA, Carvalho MS. Tuberculose no Brasil: construção de um sistema de vigilância de base territorial. Rev Saude Publica. 2005;39(1):82-9.

2. Saúde [homepage on the Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; SINAN - [cited 03 Set 2008]. SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Available from: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/>
3. Alves R, Sant'Anna CC, March MF, Ormonde LR, Cruz KC, Gonçalves CM. Comprovação bacteriológica de tuberculose em crianças como validação dos critérios diagnósticos. *Arq Bras Pediatr.* 1995;2:15-21.
4. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(4 Pt 1):1376-95.
5. Kox LF, Rhienthong D, Miranda AM, Udomsantisuk N, Ellis K, van Leeuwen J, et al. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1994;32(3):672-8.
6. Pierre C, Olivier C, Lecossier D, Boussougant Y, Yeni P, Hance AJ. Diagnosis of primary tuberculosis in children by amplification and detection of mycobacterial DNA. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147(2):420-4.
7. Abath, FGC, Werkhauser RP, Melo FL, inventors; FIOCRUZ, assignee. Método, kit e iniciadores para a identificação de seqüências específicas de nucleotídeos através da reação em cadeia da polimerase tipo nested em um único tubo de reação. Repartição de Patente do Brasil (INPI) BRPI015740-5. 2001 Nov 29.
8. Lima KV, Lopes ML, Loureiro EC, Costa MM, Cardoso NC, Lima GL, et al. Nested-PCR for gene that encodes the antigen b applied to the diagnosis of pulmonary tuberculosis [Article in Portuguese]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40(2):212-5.
9. Portillo-Gómez L, Morris SL, Panduro A. Rapid and efficient detection of extra-pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4(4):361-70.
10. Rebollo MJ, San Juan Garrido R, Folgueira D, Palenque E, Díaz-Pedroche C, Lumbreras C, et al. Blood and urine samples as useful sources for the direct detection of tuberculosis by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;56(2):141-6.
11. Gomez-Pastrana D, Torronteras R, Caro P, Anguita ML, Barrio AM, Andrés A, et al. Diagnosis of tuberculosis in children using a polymerase chain reaction. *Pediatr Pulmonol.* 1999;28(5):344-51.

12. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142(3):725-35. Erratum in: *Am Rev Respir Dis.* 1990;142(6.1):1470.
13. Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2002.
14. Rossetti ML, Jardim SB, Rodrigues VF, Moura AR, Oliveira H, Zaha A. Improvement of Mycobacterium tuberculosis detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *J Microbiol Methods.* 1997;28(2):139-146.
15. Hellyer TJ, DesJardin LE, Assaf MK, Bates JH, Cave MD, Eisenach KD. Specificity of IS6110-based amplification assays for Mycobacterium tuberculosis complex. *J Clin Microbiol.* 1996;34(11):2843-6.
16. Rodríguez JC, Fuentes E, Royo G. Comparison of two different PCR detection methods. Application to the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *APMIS.* 1997;105(8):612-6.
17. Lima JA, Icasa EE, Menegotto BG, Fischer GB, Barreto SS. Características clínicas e epidemiológicas do adulto contagiante da criança com tuberculose. *J Pneumol.* 2004;30(3):243-52.
18. Salazar CE, Schmitz TL, Cama R, Sheen P, Franchi LM, Centeno G, et al. Pulmonary tuberculosis in children in a developing country. *Pediatrics.* 2001;108(2):448-53.
19. Sant'Anna CC, Santos MA, Franco R. Diagnosis of pulmonary tuberculosis by score system in children and adolescents: a trial in a reference center in Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2004;8(4):305-10.
20. Honoré-Bouakline S, Vincensini JP, Giacuzzo V, Lagrange PH, Herrmann JL. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *J Clin Microbiol.* 2003;41(6):2323-9.
21. Lodha R, Kabra SK. Newer diagnostic modalities for tuberculosis. *Indian J Pediatr.* 2004;71(3):221-7.
22. Khan MA, Mirza SH, Abbasi SA, Butt T, Anwar M. Peripheral blood-based polymerase chain reaction in diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2006;18(2):25-8.
23. Mello FC. Modelos preditivos para o diagnóstico da tuberculose pulmonar paucibacilar [thesis]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2001.
24. Scherer LC, Sperhake RD, Jarczewski C, Cafrune PI, Minghelli S, Ribeiro MO, et

- al. PCR colorimetric dot-blot assay and clinical pretest probability for diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in smear-negative patients. *BMC Public Health*. 2007;7:356.
25. Cho SN, Brennan PJ. Tuberculosis: diagnostics. *Tuberculosis (Edinb)*. 2007;87 Suppl 1:S14-7.
26. Honore S, Vincensini JP, Hocqueloux L, Noguera ME, Farge D, Lagrange P, et al. Diagnostic value of a nested polymerase chain reaction assay on peripheral blood mononuclear cells from patients with pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001;5(8):754-62.
27. Folgueira L, Delgado R, Palenque E, Noriega AR. Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculous meningitis in AIDS patients. *Neurology*. 1994;44(7):1336-8.
28. Sperhackle RD, Mello FC, Zaha A, Kritski A, Rossetti ML. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004;8(3):312-7.
29. Restrepo BI, Gomez DI, Shipley GL, McCormick JB, Fisher-Hoch SP. Selective enrichment and detection of mycobacterial DNA in paucibacillary specimens. *J Microbiol Methods*. 2006;67(2):220-9.
30. Melo FA, Afiune BJ, Macedo LG. Características da tuberculose pulmonar num serviço de referência antes e após a implantação do Sistema único de Saúde. *J Pneumol*. 1992;18(Suppl 1):118.

Sobre os autores:

Juliana Figueirêdo da Costa Lima

Mestre em Saúde Pública. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz - Recife (PE) Brasil.

Lilian Maria Lapa Montenegro

Tecnologista. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz - Recife (PE) Brasil.

Rosana de Albuquerque Montenegro

Doutoranda em Saúde Pública. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz - Recife (PE) Brasil.

Marta Maciel Lyra Cabral

Professora Adjunta do Departamento de Pediatria. Universidade Federal de Pernambuco
- UFPE - Recife (PE) Brasil.

Andrea Santos Lima

Mestranda em Saúde Pública. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz - Fiocruz - Recife (PE) Brasil.

Frederico Guilherme Coutinho Abath (in memoriam)

Pesquisador Titular. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz -
Fiocruz - Recife (PE) Brasil.

Haiana Charifker Schindler

Pesquisador Titular. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz -
Fiocruz - Recife (PE) Brasil.

Trabalho realizado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz - Recife
(PE) Brasil.

Endereço para correspondência: Juliana Figueirêdo da Costa Lima. Av. Professor Moraes Rego, s/n,
Cidade Universitária, CEP 50670-420, Caixa Postal 7472, Recife, PE, Brasil.
Tel 55 81 2101-2569. E-mail: jfel@cpqam.fiocruz.br

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação Oswaldo Cruz
(FIOCRUZ), do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
(PDTIS), da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
(FACEPE) e da Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose (Rede-TB).

PROTOCOLO DE PESQUISA DE TUBERCULOSE

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

21. Quantas pessoas moram na casa do paciente? 1. Até 3 <input type="checkbox"/> 2. De 4 a 6 <input type="checkbox"/> 3. Mais de 6 <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>	22. Quantos adultos? 1. Até 2 <input type="checkbox"/> 2. De 3 a 5 <input type="checkbox"/> 3. Mais que 5 <input type="checkbox"/>	23. Quantas crianças? 1. Até 2 <input type="checkbox"/> 2. De 3 a 5 <input type="checkbox"/> 3. Mais que 5 <input type="checkbox"/>	24. Quantos cômodos (locais de dormir) têm na casa? 1. Um <input type="checkbox"/> 2. De 2 a 4 <input type="checkbox"/> 3. Mais de 4 <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>
25. O senhor(a) ou algum adulto na casa fuma? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>	26. O senhor(a) ou alguém na casa bebe? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>	27. Existe algum caso de HIV na família? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>	
28. Existe algum caso de alcoolismo na família? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>	29. Uso de drogas na família 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>	30. Existe alguém da família ou do convívio que faz tratamento prolongado para TB? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 3. Sim - não sabe informar a doença <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>	
31. Raça/Cor 1. Branca <input type="checkbox"/> 2. Preta <input type="checkbox"/> 3. Parda <input type="checkbox"/> 4. Amarela <input type="checkbox"/> 5. Indígena <input type="checkbox"/>			
DADOS EPIDEMIOLÓGICOS			
30. Existe algum caso de tuberculose na família ou em pessoa de convívio? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 31. Caso sim, há quanto tempo? _____ Caso a resposta seja Não, seguir para 39		32. O caso foi confirmado? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> Caso a resposta seja Não, pular para 34	
33. O caso foi confirmado por baciloscopia e/ou cultura? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	34. Qual o grau de parentesco? 1. Mãe <input type="checkbox"/> 2. Pai <input type="checkbox"/> 3. Irmã (o) <input type="checkbox"/> 4. Avô (ó) <input type="checkbox"/> 5. Tio (a) <input type="checkbox"/> 6. Primo (a) <input type="checkbox"/> 7. Outro <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> Outro: _____		
35. Período de duração do contato: 1. < 3 meses <input type="checkbox"/> 2. 3 meses a 2 anos <input type="checkbox"/> 3. + que 2 anos <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	36. Qual o tipo de contato? 1. Intradomiciliar contínuo (5 a 7 dias/semana, > 6h/dia) <input type="checkbox"/> 2. Intradomiciliar intermitente (5 a 7 dias/semana, < 6h/dia) <input type="checkbox"/> 3. Esporádico (entre 2 a 4 dias/semana) <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>		
37. Em relação ao tratamento para TB o contato: 1. Foi tratado totalmente <input type="checkbox"/> 2. Está em tratamento <input type="checkbox"/> 3. Não tratado <input type="checkbox"/> 4. Interrompeu o tratamento <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> Caso não tenha havido interrupção, seguir para 39.	38. Qual o motivo da interrupção: 1. Intolerância ao medicamento <input type="checkbox"/> 2. Falta de medicamento <input type="checkbox"/> 3. Abandono do tratamento <input type="checkbox"/> 4. Outro motivo <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>		

ANTECEDENTES DO PACIENTE

39. Já teve alguma doença? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div> <p>Caso a resposta seja Não, seguir para 41</p>	40. Qual doença? 1. Asma 6. Fibrose Cística 2. Pneumonia 7. HIV/AIDS 3. Bronquite 8. Câncer 4. Tuberculose 9. Não sabe 5. Diabetes 10. Outro: _____ <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	
41. Tem cicatriz de BCG? (vista pelo entrevistador no braço direito ou através de cartão) 1. Sim 2. Não 8. Não verificado <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>		
43. Fez PPD anterior? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe Data de realização: ____/____/____ (Vê no cartão) Caso não tenha feito, seguir para 45. <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	44. Resultado do PPD: 1. Não reator (0-4mm) 4. Reator muito forte (>15mm) 2. Reator fraco (5-9mm) 8. Não sabe informar 3. Reator forte (10-14mm) 9. Inaplicável <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	
45. Toma algum medicamento atualmente? 1. Sim 2. Não Qual: _____ <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	46. Já fez TTO para tuberculose? 1. Sim 2. Não Qual: _____ Caso sim, quanto tempo? _____ Caso sim, número de TTO anteriores: _____ <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (referidos pelo Informante)		
47. Há quanto tempo o paciente está doente? <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 10px;"> <input style="width: 30px; height: 20px; margin-right: 5px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px; margin-right: 5px;" type="text"/> meses <input style="width: 30px; height: 20px; margin-right: 5px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px; margin-right: 5px;" type="text"/> dias </div>	48. Tem febre? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe Caso sim, há quanto tempo: <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	49. Perda de peso? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>
50. Tem tosse? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe Caso sim, há quanto tempo: <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	51. Tipo de tosse: 1. Seca 2. Produtiva 3. Hemoptise 9. Inaplicável <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	52. Tem falta de apetite? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>
56. Tem fraqueza muscular? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	57. Apresenta falta de ar desde que ficou doente? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	58. Tem dor nas juntas? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe Caso não, seguir para 60. <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>
59. Qual o local? 1. Joelho 2. Cotovelo 3. Punho 4. Coluna <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	60. Apresenta dor na barriga? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	61. Notou aumento da barriga? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>
62. Notou linfonodo (lândria ou íngua) aumentado? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	63. Local do linfonodo: 1. Pescoço 2. Axila 3. Região inguinal (virilha) Outros _____ <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	64. Apresenta suor noturno? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>

INVESTIGAÇÃO CLÍNICA (preenchida pelo médico acompanhante)

Médico Responsável:		Fone:		
65. Peso _____ Kg	66. Estatura _____ m			
1. Sim 2. Não 8. Não investigado				
68. Palidez <input type="checkbox"/>	69. Adinamia <input type="checkbox"/>	70. Toxemia <input type="checkbox"/>	71. Desnutrição <input type="checkbox"/>	
72. Linfadenomegalia Cervical: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não investigado		73. Linfadenomegalia Axilar: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não investigado		
74. Linfadenomegalia Inguinal: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não investigado	75. Linfadenomegalia em outro local: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não investigado	76. Apresenta micropoliadenomegalia generalizada? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não investigado		
77. Presença de sinais inflamatórios: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não investigado 9. Inaplicável				
1. Sim 2. Não 8. Não investigado				
81. Taquipnéia <input type="checkbox"/>	82. Eupnéico <input type="checkbox"/>	83. Dispnéia <input type="checkbox"/>	84. Cianose <input type="checkbox"/>	85. BAN <input type="checkbox"/>

Ausculta (83 ao 89) 1. Sim 2. Não 8. Não investigado					
83. MV Normal <input type="checkbox"/>	84. MV diminuído <input type="checkbox"/>	85. MV ausente <input type="checkbox"/>	86. Roncos <input type="checkbox"/>	87. Crepitação <input type="checkbox"/>	88. Sibilância <input type="checkbox"/>
89. Broncofonia <input type="checkbox"/>	90. Aparelho cardíaco: 1. Normal <input type="checkbox"/> 2. Alterado <input type="checkbox"/> Caso seja Normal, seguir para 94		Tipo de alteração: Sopro: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não investigado	92. Arritmia: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não investigado	93. Outros: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não Investigado _____
94. Abdome: 1. Normal 2. Hepatomegalia 3. Ascite			95. Sistema Nervoso: 1. Normal <input type="checkbox"/> 2. Alterado <input type="checkbox"/>		
4. Esplenomegalia <input type="checkbox"/>		5. Hepatoesplenomegalia 6. Outros _____			

96. Se alterado, especifique: _____ _____		97. Sist. Músculo-esquelético: 1. Normal <input type="checkbox"/> 2. Alterado <input type="checkbox"/> Caso seja Normal, seguir para 104		98. Localização da(s) articulação(ões) acometida(s): _____ _____	
Tipo de alteração: 99. Edema: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	100. Calor: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	101. Dor: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	102. Rubor: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	103. Deformidades: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	
EXAMES LABORATORIAIS (preenchido pelo médico pesquisador)					
104. Realizou hemograma? 1. Sim <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 110		105. Resultado da Hemoglobina <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> (g/dL)		106. Alteração do leucograma 1. Sim 2. Não 3. Não sabe	
107. Caso sim: 1. Características de Infecção viral 2. Características de infecção bacteriana 3. Não sabe		109. Valor do VSH <input type="text"/> <input type="text"/> mm			
110. Realizou Raio X de Tórax na admissão? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 112		111. Resultado do Raio X de admissão: 1. Normal <input type="checkbox"/> 2. Alterado <input type="checkbox"/>		- Se alterado: <input type="checkbox"/> 1. Padrão não sugestivo de TB 2. Forma Pneumônica 3. Forma Pneumoganglionar 4. Forma Pleuropulmonar 5. Forma Miliar 6. Forma Ganglionar 7. Inaplicável 8. Não sabe informar	
112. Realizou Raio X de tórax de controle? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 114		113. Resultado do Raio X de controle: 1. Normalizou <input type="checkbox"/> 2. Houve melhora 3. Houve piora 8. Não sabe informar 9. Inaplicável			
114. Realizou Tomografia de tórax? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 116		115. Resultado da Tomografia de tórax: 1. Normal <input type="checkbox"/> 2. Alterado sugestivo 3. Alterado inespecífico 8. Não sabe informar 9. Inaplicável			
116. Realizou PPD para pesquisa? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 118		117. Resultado do PPD: 1. Não reator (0-4mm) <input type="checkbox"/> 2. Reator fraco (5-9mm) <input type="checkbox"/> 3. Reator forte (10-14mm) <input type="checkbox"/> 4. Reator muito forte (>15mm) <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>			

121. Realizou Baciloscopia? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 124	122. Resultado da baciloscopia: 1. Positiva 2. Negativa 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> _____ Cruzes	123. Material da baciloscopia: 1. Escarro 2. Lavado gástrico 3. Líquor 4. Biópsia <input type="checkbox"/> 5. Outro material 9. Inaplicável Outro _____
124. Realizou Cultura em meio Lowestein-Jensen? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 130.	125. Resultado da Cultura: 1. Positiva 2. Negativa 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	126. Material da Cultura: 1. Escarro 2. Sangue 3. Urina 4. Lavado gástrico 5. Líquor 6. Biópsia <input type="checkbox"/> 7. Outro material 9. Inaplicável Outro _____
136. Diagnóstico inicial 1. TB infecção 2. TB doença <input type="checkbox"/> 3. TB suspeita 4. Não é TB	137. Data da notificação: Data: ____/____/____ Profissional que notificou: -----	Se Extra pulmonar: 1. Ganglionar Periférica 2. Ganglionar Pulmonar 3. Meningoencefálica 4. Miliar 5. Óssea <input type="checkbox"/> 6. Pleural 7. Outra 8. Inaplicável
138. Diagnóstico Final 1. TB infecção 2. TB doença <input type="checkbox"/> 3. TB suspeita 4. Não é TB	139. Forma de TB 1. Pulmonar 2. Extra pulmonar <input type="checkbox"/>	
140. Tratamento realizado: 1. Profilaxia primária (INH por 3 meses) <input type="checkbox"/> 2. Profilaxia secundária (INH por 6 meses) 3. Esquema I (INH + RMP por 6 meses e PZA por 2 meses) - Tradicional 4. Esquema IR (INH + RMP + BEM por 6 meses e PZA por 2 meses) 5. Esquema II (INH + RMP por 9 meses e PZA por 2 meses) 6. Esquema III (SM + PZA por 3 meses e ETH + EM por 12 meses) 9. Inaplicável	141. Data do início do tratamento: _____/_____/____	
142. Tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico de TB: 1. ≤ 1 mês 2. 1 – 3 meses <input type="checkbox"/> 3. ≥ 3 meses 4. Não investigado	143. Tempo entre o diagnóstico de TB e início do tratamento específico: 1. ≤ 1 mês 2. 1 – 3 meses <input type="checkbox"/> 3. ≥ 3 meses 4. Não investigado	
EVOLUÇÃO		
144- Resposta ao tratamento específico (feita pelo médico acompanhante) 1. Melhora clínica evidente após 30 dias de início do tratamento (Resposta ao tratamento) <input type="checkbox"/> 2. Não houve melhora clínica evidente após 30 dias de início do tratamento (Não houve resposta ao tratamento) 9. Inaplicável		
Entrevistador: _____	Assinatura: _____	

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

145. Realizou Nested-PCR pré-tratamento? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ___/___/___	146. Resultado 1. Positivo 2. Negativo 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	147. Amostra biológica: 1. <input type="checkbox"/> Sangue total 6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas 8. <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro 9. <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico 99 <input type="checkbox"/> Não se aplica
148. Realizou Nested-PCR Único Tubo pré-tratamento? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ___/___/___	149. Resultado 1. Positivo 2. Negativo 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	150. Amostra biológica: 1. <input type="checkbox"/> Sangue total 6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas 8. <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro 9. <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico 99 <input type="checkbox"/> Não se aplica
151. Realizou PCR colorimétrica pré-tratamento? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ___/___/___	152. Resultado 1. Positivo 2. Negativo 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	153. Amostra biológica: 1. <input type="checkbox"/> Sangue total 6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas 8. <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro 9. <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico 99 <input type="checkbox"/> Não se aplica
154. Realizou RT-PCR pré-tratamento? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ___/___/___	155. Resultado 1. Positivo 2. Negativo 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	156. Amostra biológica: 1. <input type="checkbox"/> Sangue total 6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas 8. <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro 9. <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico 99 <input type="checkbox"/> Não se aplica

Responsável pelo preenchimento da ficha: _____

Responsável pelos exames moleculares: _____

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O GRUPO DE ESTUDO

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a), da pesquisa - “DETECÇÃO DO *Mycobacterium tuberculosis* EM AMOSTRAS DE SANGUE E URINA ATRAVÉS DA NESTED-PCR EM ÚNICO TUBO (SINGLE NESTED-PCR – STNPCR)”, após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em **duas vias**. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do Projeto: “DETECÇÃO DO *Mycobacterium tuberculosis* EM AMOSTRAS DE SANGUE E URINA ATRAVÉS DA NESTED-PCR EM ÚNICO TUBO (SINGLE NESTED-PCR – STNPCR)”

Pesquisador (a) Responsável: Juliana Figueirêdo da Costa Lima

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

Pesquisadores Participantes: Lílian Maria Lapa Montenegro, Haiana Charifker Schindler.

Objetivo da pesquisa: O objetivo da nossa pesquisa é desenvolver um método molecular para o diagnóstico de tuberculose paucibacilar.

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

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

Para a nossa pesquisa coletaremos 5ml de sangue (equivalente a meia colher de sopa), 30ml de urina e de 1 a 5ml de escarro (quando o paciente conseguir escarrar), onde serão encaminhadas ao laboratório de Imunoepidemiologia do departamento de Imunologia do CPqAM para ser submetida a técnica de PCR por profissionais capacitados. Os resultados de todos os exames serão encaminhados ao médico responsável pelo atendimento. As amostras serão congeladas e armazenadas para uso futuro, caso seja necessário.

Riscos e Benefícios: O Sr(a) não será submetido a qualquer desconforto adicional e os riscos que uma coleta sanguínea envolve serão minimizados seguindo-se as normas de biossegurança. Eventualmente pode haver formação de edema no local da coleta ou um pouco de dor no momento da introdução da agulha para coleta do sangue. Seguiremos a rotina estabelecida pelo profissional de saúde, seja a nível ambulatorial ou enfermaria. O benefício deste estudo será contribuir para o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, específicas, rápidas e menos dolorosas que possam ser adequadas à realidade do nosso sistema público de saúde, e a padronização de critérios mais eficazes que irão beneficiar o diagnóstico precoce da tuberculose paucibacilar.

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



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

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia
Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária.
Campus da UFPE.
Fone: (81) 2101-2569

Contato: Lílian Maria Lapa Montenegro, Dra. Haiana Charifker Schindler, Juliana Figueirêdo da Costa Lima.

CONSENTIMENTO

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

Nome do Paciente: _____

Assinatura do paciente ou do responsável

Assinatura do médico/pesquisador

_____, ____/____/____.

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA INDIVÍDUOS SEM SUSPEITA DE TUBERCULOSE

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a), da pesquisa – “DETECÇÃO DO *Mycobacterium tuberculosis* EM AMOSTRAS DE SANGUE E URINA ATRAVÉS DA NESTED-PCR EM ÚNICO TUBO (SINGLE NESTED-PCR – STNPCR)”, após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assinar ao final deste documento, que está em **duas vias**. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do Projeto de Pesquisa: “DETECÇÃO DO *Mycobacterium tuberculosis* EM AMOSTRAS DE SANGUE E URINA ATRAVÉS DA NESTED-PCR EM ÚNICO TUBO (SINGLE NESTED-PCR – STNPCR)”.

Pesquisadora Responsável: Juliana Figueirêdo da Costa Lima

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

Pesquisadores Participantes: Lílian Maria Lapa Montenegro, Haiana Charifker Schindler.

Objetivos: O objetivo da nossa pesquisa é desenvolver um método molecular para o diagnóstico de tuberculose paucibacilar.

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

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

Para a nossa pesquisa coletaremos 5ml de sangue (equivalente a meia colher de sopa), 30ml de urina e de 1 a 5ml de escarro (quando o paciente conseguir escarrar), que serão encaminhadas ao Laboratório de Imunoepidemiologia do Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ para ser submetida a técnica de PCR por profissionais capacitados. Os resultados de todos os exames serão encaminhados ao médico responsável pelo atendimento. As amostras serão congeladas e armazenadas para uso futuro, caso seja necessário.

Riscos e Benefícios: O Sr(a) não será submetido a qualquer desconforto adicional e os riscos que uma coleta sanguínea envolve serão minimizados seguindo-se as normas de biossegurança. Eventualmente pode haver formação de edema no local da coleta ou um pouco de dor no momento da introdução da agulha para coleta do sangue. Seguiremos a rotina estabelecida pelo profissional de saúde, seja a nível ambulatorial ou enfermária. O benefício deste estudo será contribuir para o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, específicas, rápidas e menos dolorosas que possam ser adequadas à realidade do nosso sistema público de saúde, e a padronização de critérios mais eficazes que irão beneficiar o diagnóstico precoce da tuberculose paucibacilar.



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

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

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia

Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária.

Campus da UFPE.

Fone: (81) 2101-2569

Contato: Lílian Maria Lapa Montenegro, Dra. Haiana Charifker Schindler, Juliana Figueirêdo da Costa Lima.

CONSENTIMENTO

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

Nome do Paciente: _____

Assinatura do paciente ou do responsável

Assinatura do médico/pesquisador

_____, ____/____/____.



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: Detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de sangue e urina através de STNPCR

Pesquisador responsável: Juliana Figueiredo da Costa Lima

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/NESC

Data de apresentação ao CEP: 22/10/2008

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 135/08

Registro no CAAE: 0133.0.095.000-08

PARECER N° 134/2008

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 23 de dezembro de 2011. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 23 de dezembro de 2008.


Alberto Fernandes Freyre
Professor
Vice-Coordenador
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 23/12/2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)