

**GABRIELA GASPAR CARNEVALE**

**Análise de interferentes na extração, amplificação e detecção de  
*M. tuberculosis* por reação de PCR em amostras de líquido pleural,  
escarro e lavado broncoalveolar**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências

Programa de: Pneumologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leila Antonangelo

**São Paulo**

**2015**

**GABRIELA GASPAR CARNEVALE**

**Análise de interferentes na extração, amplificação e detecção de  
*M. tuberculosis* por reação de PCR em amostras de líquido pleural,  
escarro e lavado broncoalveolar**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências

Programa de: Pneumologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leila Antonangelo

**São Paulo**

**2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carnevale, Gabriela Gaspar

Análise de interferentes na extração, amplificação e detecção de *M.tuberculosis* por reação de PCR em amostras de líquido pleural, escarro e lavado broncoalveolar / Gabriela Gaspar Carnevale. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Pneumologia.

Orientador: Leila Antonangelo.

Descritores: 1.Tuberculose 2.Escarro 3.Lavagem broncoalveolar 4.Líquidos corporais 5.Líquido extracelular 6.Reação em cadeia da polimerase/métodos

USP/FM/DBD-342/15

*Ao meu marido, Sérgio e aos meus pais,  
Edson e Regina, pelo constante apoio,  
incentivo, compreensão e amor dedicado.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a **Deus**, por me guiar e proteger em todos os momentos.

À minha **família**, pelo incentivo e apoio nesta jornada.

À **Profª Drª Leila Antonangelo**, pela confiança, incentivo e cobrança nos momentos certos.

Aos meus chefes e colegas do **Setor de Biologia Molecular**, pela ajuda, compreensão, convívio e aprendizado. Em especial, à minha **amiga Evelyn**, pela idéia inicial deste trabalho, além do grande carinho e amizade.

À **Profª Drª Lisete, Dra Milena e Prof Dr Evaldo**, pela oportunidade tão valiosa que vocês me proporcionaram ao permitir meu estágio no Laboratório de Pleura. Obrigada pelo carinho e ensinamentos.

Aos colegas do **Laboratório de Pleura**, pelo auxílio neste trabalho. Em especial ao meu **grande amigo Carlos**, que sempre me incentivou, ouviu, ensinou e me aconselhou em todos os momentos.

À **Lia Marçal**, pela ajuda e disposição neste trabalho.

Ao **Grupo de Pleura** pela grande ajuda na coleta das amostras e ensinamento proporcionado.

Aos **Grupos de Asma e de Broncoscopia** pelo auxílio na coleta das amostras.

À **Seção de Citologia e Seção de Genética**, pela ajuda, apoio e paciência em todos os momentos .

À **Seção de Hematologia**, pelo auxílio técnico.

À **Comissão de Pós-Graduação de Pneumologia**, pelo apoio e ensinamentos durante este período.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

À **USP**, Universidade de São Paulo, pela infraestrutura acadêmica e laboratorial.

Enfim, a todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, me ajudaram na concretização deste trabalho.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”

Marcel Proust

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

## SUMÁRIO

**Lista de Tabelas**

**Lista de Figuras**

**Resumo**

**Abstract**

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                                                                | 01 |
| 1.1 Histórico/Epidemiologia .....                                                                         | 02 |
| 1.2 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....                                                      | 03 |
| 1.3 Patogênese .....                                                                                      | 04 |
| 1.4 Diagnóstico .....                                                                                     | 06 |
| <b>2. OBJETIVO</b> .....                                                                                  | 11 |
| <b>3. MÉTODOS</b> .....                                                                                   | 13 |
| 3.1 Preparo das amostras biológicas com as variáveis pré-analíticas ....                                  | 15 |
| 3.2 Preparação das diluições seriadas de <i>M. tuberculosis</i> para<br>inoculação nos tubos testes ..... | 16 |
| 3.3 Descrição dos métodos de extração e amplificação/detecção<br>utilizados (variáveis analíticas) .....  | 17 |
| 3.4 Extração do DNA .....                                                                                 | 18 |
| 3.5 Amplificação e detecção .....                                                                         | 19 |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....                                                                                | 22 |
| 4.1 Escarro .....                                                                                         | 23 |
| 4.2 Lavado Broncoalveolar .....                                                                           | 25 |
| 4.3 Líquido Pleural .....                                                                                 | 26 |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....                                                                                 | 30 |
| 5.1 Limitações do estudo .....                                                                            | 40 |
| <b>6. CONCLUSÕES</b> .....                                                                                | 42 |
| <b>7. REFERÊNCIAS</b> .....                                                                               | 44 |

**Anexos**

**Apêndice**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Preparação das amostras biológicas nos grupos de acordo com a concentração das variáveis pré-analíticas avaliadas..... 15
- Tabela 2.** Concentrações de *M. tuberculosis* obtidos pela escala de McFarland e quantidade de DNA micobacteriano dosado por espectrofotometria..... 23

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema da inoculação seriada do *M. tuberculosis*..... 16
- Figura 2.** Resumo dos ensaios utilizados no estudo..... 18
- Figura 3.** Demonstração da detecção de UFC/mL de *M. tuberculosis* em amostras de escarro com diferentes combinações de métodos de extração/detecção, considerando-se os grupos de variáveis pré-analíticas avaliadas ..... 24
- Figura 4.** Demonstração da detecção de UFC/mL de *M. tuberculosis* em amostras de lavado broncoalveolar com diferentes combinações de métodos de extração/detecção considerando-se os grupos de variáveis pré-analíticas avaliadas..... 26
- Figura 5.** Demonstração da detecção de UFC/mL de *M. tuberculosis* em amostras de líquido pleural com diferentes combinações de métodos de extração/detecção, considerando-se os grupos de variáveis pré-analíticas avaliadas..... 28
- Figura 6.** Demonstração da detecção de UFC/mL de *M. tuberculosis* em amostra de exsudato pleural de etiologia tuberculosa com diferentes combinações de métodos de extração/detecção..... 29

## RESUMO

Carnevale GG. **Análise de interferentes na extração, amplificação e detecção de *M. tuberculosis* por reação de PCR em amostras de líquido pleural, escarro e lavado broncoalveolar** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

**Introdução:** A tuberculose (TB) é uma das infecções mais prevalentes na humanidade, sendo o comprometimento pulmonar a principal causa de morbimortalidade. A cultura é o padrão de referência para diagnóstico, porém apresenta baixa sensibilidade. Das formas extrapulmonares, a TB pleural é a mais comum e apresenta diagnóstico confirmatório difícil por ser paucibacilar e conter interferentes intrínsecos na amostra. A reação em cadeia da polimerase (PCR), por amplificar o DNA da micobactéria, apresenta-se como teste mais sensível que a cultura, sendo positivo em amostras que apresentam a partir de  $10^2$  UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mL) de *M. tuberculosis* (MTB). Entretanto, quando utilizada em amostras de escarro, lavado broncoalveolar e/ou líquido pleural pode ter seu desempenho comprometido pela presença de inibidores intrínsecos da amostra (variáveis pré-analíticas) e pelas técnicas de amplificação e detecção (variáveis analíticas) utilizadas na reação. **Objetivo:** Avaliar a influência de variáveis pré-analíticas (concentração de células, hemácias e proteínas) na detecção do DNA do *M. tuberculosis* em amostras de escarro, lavado broncoalveolar (LBA) e líquido pleural (LP), utilizando combinações de métodos de extração/detecção. **Métodos:** Amostras de escarro, lavado broncoalveolar e líquido pleural de pacientes não infectados pelo *M. tuberculosis* foram obtidas através de indução à expectoração, broncoscopia respiratória e/ou toracocentese, respectivamente, em volumes suficientes para o estudo. Para testar o limiar de detecção do *M. tuberculosis*, as amostras foram preparadas “in vitro” de maneira a conter concentrações variadas dos interferentes pré-analíticos e de UFC/mL da micobactéria. Para a técnica de PCR, o DNA foi extraído pelo método de extração QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) e pelo AMPLICOR® Respiratory Specimen Preparation (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) e

amplificado e detectado por três métodos: 1) COBAS® TaqMan® MTB Test (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA); 2) MTB Q – PCR Alert Kit (Nanogen Advanced Diagnosis, Trezzano, Italy) e 3) “in-house” ou caseiro. Desta maneira, foram testadas as seguintes combinações: Extração Roche/deteção Roche (R/R); Extração Roche/deteção Nanogen (R/N); Extração Roche/deteção “in house” (R/IH); Extração Qiagen/deteção Roche (Q/R); Extração Qiagen/deteção Nanogen (Q/N) e Extração Qiagen/deteção “in house” (Q/IH). **Resultados:** Em amostras de escarro, a quantidade de células e de hemácias não interferiu na deteção do *M. tuberculosis*, com exceção do método de extração/deteção Roche. Nas amostras de LBA, médias e altas concentrações de células e altas concentrações de hemácias contribuíram para menor deteção do MTB quando utilizado o método de deteção Roche, enquanto que no líquido pleural, a concentração de hemácias foi a variável que mais interferiu na deteção do agente. Em ambas as situações a menor deteção foi obtida com a combinação Q/N. **Conclusão:** A qualidade pré-analítica das amostras biológicas recebidas no laboratório clínico pode interferir no desempenho diagnóstico dos testes moleculares. A escolha dos métodos de extração e deteção é de fundamental importância na sensibilidade analítica do teste, para garantia de melhores resultados, especialmente quando trabalhamos com amostras paucibacilares que contém potenciais inibidores da reação.

Descritores: tuberculose, escarro, líquido da lavagem broncoalveolar, líquidos corporais, líquido extracelular, reação em cadeia da polimerase/métodos.

## ABSTRACT

Carnevale GG. **Analysis of interfering in the extraction, amplification and detection of *M. tuberculosis* by PCR reaction in pleural fluid, sputum and bronchoalveolar lavage samples** [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

**Introduction:** Tuberculosis (TB) is one of the most prevalent infections in humanity, and pulmonary compromise is the leading cause of morbidity and mortality. Culture is the reference standard for diagnosis, but has low sensitivity. Of the extrapulmonary forms, pleural TB is the most common and presents difficult confirmatory diagnosis due to be paucibacillary and to contain intrinsic interfering in the sample. The polymerase chain reaction (PCR), for amplifying DNA of the mycobacterium, appears as more sensitive test than the culture, with positive results from  $10^2$  CFU/ml (colony forming units per ml) of *M. tuberculosis* (MTB). However, when used in sputum samples, bronchoalveolar lavage and/or pleural fluid, this test can also have its performance compromised by the presence of intrinsic sample inhibitors (pre-analytical variables) and by the amplification and detection techniques (analytical variables) used in the reaction. **Objective:** To evaluate the influence of pre-analytical variables (concentration of cells, red blood cells and proteins) in DNA detection of *M. tuberculosis* from sputum, bronchoalveolar lavage (BAL) and pleural fluid (PF) samples by using combinations of extraction/detection methods. **Methods:** Samples of sputum, bronchoalveolar lavage and pleural fluid of patients not infected with *M. tuberculosis* were obtained by inducing sputum, respiratory bronchoscopy and/or thoracentesis, respectively, in sufficient volumes for the study. To test the detection threshold of *M. tuberculosis*, samples were prepared "in vitro" to contain variable concentrations of pre-analytical interfering and CFU/mL of mycobacteria. For PCR, DNA was extracted by two methods: the QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and Respiratory Specimen Preparation Amplicor (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) and amplified and detected by three methods: 1) COBAS® TaqMan® MTB Test (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA); 2) MTB Q -

PCR Alert Kit (Nanogen Advanced Diagnosis, Trezzano, Italy) and 3) "in-house". Thus, the following combinations were tested: Roche extraction and detection (R/R); Roche extraction and Nanogen detection (R/N); Roche extraction and "in house" detection (R/IH); Qiagen extraction and Roche detection (Q/R); Qiagen extraction and Nanogen detection (Q/N) and Qiagen extraction and "in house" detection (Q/IH). **Results:** In sputum samples, the amount of cells and red blood cells did not interfere with *M. tuberculosis* detection, an exception for Roche extraction/detection method. In BAL samples, medium and high cell concentrations and high concentrations of red blood cells contributed to lower detection of MTB when using the Roche detection method, while in the pleural fluid, the concentration of red blood cells was the variable that most interfered with the MTB detection. In both situations, the smallest detection was obtained with the combination Q/N. **Conclusion:** The pre-analytical quality of biological samples received in the clinical laboratory can interfere with the performance of molecular diagnostic tests. The choice for the extraction/detection methods is of fundamental importance in the analytical sensitivity of PCR, in order to guarantee better results, especially when working with paucibacillary samples containing potential reaction inhibitors.

Descriptors: tuberculosis, sputum, bronchoalveolar lavage fluid, body fluid, extracellular fluid, polymerase chain reaction/methods.

# INTRODUÇÃO

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico/Epidemiologia

Para introduzir o tema “Tuberculose” é preciso citar a palestra de Robert Koch, proferida em 24 de março de 1882 em Berlim, a qual ele inicia descrevendo uma bactéria em forma de bastonete - o *Mycobacterium tuberculosis* - e que representou o primeiro grande passo da era moderna na luta contra a tuberculose<sup>1,2</sup>.

A tuberculose (TB) é uma das infecções mais prevalentes na humanidade, sendo responsável por 8 a 10 milhões de novos casos e 2 milhões de mortes a cada ano, dos quais apenas quatro milhões apresentam-se com baciloscopia positiva. Ainda nos dias atuais representa um grande desafio para a Saúde Pública, principalmente nos países menos desenvolvidos e nos países chamados emergentes<sup>3,4</sup>.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, até 2015, aproximadamente um bilhão de pessoas terão sido infectadas, cerca de 200 milhões irão desenvolver a doença e 35 milhões morrerão de tuberculose, dados estes que mostram a relevância de se investir em pesquisas que discutam formas de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença<sup>5,6</sup>.

Em 2006, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou a estratégia *Stop TB*, que possuía metas para reverter a disseminação da tuberculose até 2015<sup>7</sup>. Estas metas visavam contribuir para o fortalecimento e melhoria do sistema de saúde com base na atenção primária à saúde, identificação de TB/HIV, TB multi-resistente e das necessidades das populações pobres e vulneráveis<sup>8,9</sup>.

Em Março de 2014, a OMS e seus parceiros anunciaram uma estratégia de tuberculose pós-2015 e metas de acompanhamento com o objetivo de acabar com a epidemia mundial. Esta estratégia ambiciosa reduzir a incidência de tuberculose em 90% até 2035 (em comparação com a incidência de 2015) através do diagnóstico precoce e do rastreamento sistemático (caso busca ativa) de contatos e de grupos de alto risco<sup>10-12</sup>.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o Brasil ocupa o 19º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo e o 108º lugar em incidência<sup>13</sup>. A OMS estima que havia uma incidência de 83 mil casos de tuberculose no Brasil em 2011 e uma taxa de incidência anual de 42 casos por 100.000 habitantes<sup>14</sup>. Estima-se que esta incidência venha caindo constantemente nas duas últimas décadas e, embora em nível nacional mais de 90% dos casos estimados sejam detectados e reportados, as taxas de sucesso de tratamento permanecem abaixo da meta necessária para erradicar a doença no futuro próximo<sup>15,16</sup>.

Além do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e sua associação com tuberculose ativa e, o aumento de cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* às mais eficazes drogas anti-TB, existem outros fatores que sustentam a epidemia atual, como a expansão populacional, a pouca notificação de casos, as baixas taxas de cura em países pobres, a transmissão ativa em hospitais superlotados, prisões e outros locais públicos, a migração de pessoas provenientes de países com incidência mais elevada devido a guerras ou à fome, o abuso de drogas e a decadência social<sup>16-18</sup>.

## **1.2 Complexo *Mycobacterium tuberculosis***

A tuberculose é causada por membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), que inclui: *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), o agente etiológico da tuberculose humana; *M. africanum*, que causa a tuberculose em humanos apenas em certas regiões da África; *M. bovis*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* que causam tuberculose em mamíferos selvagens e domesticados e *M. microti*, que causa tuberculose somente em ratazanas. Decifrar o genoma de aproximadamente 4 Mbp (milhões de pares de bases) do bacilo da tuberculose possibilitou uma melhor compreensão sobre sua biologia com a identificação de novas e, de certa forma, inesperadas propriedades e permitiu a reconstrução da história do MTB como um agente infeccioso humano mundial<sup>19</sup>.

O MTB é uma micobactéria de crescimento lento com tempo de duplicação de 12-24 h em condições ideais. Uma característica importante do

bacilo é a peculiar estrutura de sua parede celular, que fornece uma barreira excepcionalmente forte e impermeável a compostos tóxicos e drogas e que desempenha um papel fundamental em sua virulência. A visão clássica da estrutura da parede celular das micobactérias foi revista com o advento de novas técnicas de microscopia eletrônica que preservam a organização da parede celular, evitando a desidratação da amostra. Graças a estes avanços, foi demonstrado que as micobactérias possuem uma membrana externa, funcionalmente semelhante ao observado em bactérias gram-negativas, que consiste em uma dupla camada lipídica assimétrica feita de ácidos graxos longos no folheto interno (ácidos micólicos) e de glicolipídios e de componentes serosos na camada exterior. A membrana interior e exterior formam um espaço periplasmático, com uma fina camada de peptidoglicano no lado mais interior, ligado de forma covalente a arabinogalactano e lipoarabinomanano que por sua vez estão ligados a ácidos micólicos. A isoniazida e o etambutol, dois dos medicamentos anti-TB mais eficazes, atuam na síntese dos ácidos micólicos e arabinogalactana, respectivamente, destacando a importância da parede celular das micobactérias no mecanismo de ação das drogas antituberculosas<sup>19</sup>.

### **1.3 Patogênese**

O comprometimento pulmonar continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade na doença. Sua evolução clínica é extremamente variável e depende da atividade, extensão e padrão de distribuição da infecção<sup>20</sup>.

A infecção pelo MTB ocorre quando poucos bacilos dispersos no ar, a partir de um paciente com tuberculose pulmonar ativa, atingem os alvéolos do hospedeiro. Neste sítio, o MTB é rapidamente fagocitado pelos macrófagos alveolares, que na maioria das vezes conseguem matar as bactérias graças à resposta imune inata. Se os bacilos sobreviverem a esta primeira linha de defesa, começam a replicar ativamente no interior dos macrófagos, se difundem para as células próximas, incluindo células epiteliais e endoteliais, chegando, em algumas semanas de crescimento exponencial, à carga

bacteriana elevada. Durante as etapas iniciais da infecção, o MTB pode se difundir para outros órgãos através dos vasos linfáticos e por disseminação hematogênica, infectando outras células e órgãos<sup>19,20</sup>.

Em sequência, uma vez que a resposta imune adaptativa entra em ação, a migração, para o local da infecção primária, de neutrófilos, linfócitos e outras células do sistema imunológico formam um infiltrado celular que assume a estrutura típica de um granuloma; uma matriz fibrótica cobre o granuloma, que se torna calcificado com os bacilos encapsulados no interior e protegido pela resposta imunológica do hospedeiro<sup>19,21</sup>. Na maioria dos casos, os pacientes são assintomáticos e as lesões sofrem fibrose e calcificações secundárias<sup>20</sup>. A grande maioria dos pacientes responde às medidas quimioterápicas atuais. O insucesso na resposta ao tratamento se associa com doença avançada, microorganismos resistentes aos fármacos convencionais ou presença de comorbidades como diabetes mellitus, AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) ou amiloidose secundária, fatores que complicam o prognóstico<sup>20,21</sup>. Em lactentes, crianças ou em adultos imunodeficientes, não raramente a doença evolui com disseminação progressiva e cavitação, pneumonia tuberculosa ou tuberculose miliar.

Dentre as formas de apresentação de doença primária, as extrapulmonares acometendo as serosas (pleura, pericárdio, peritônio e meninge), ocorrem precocemente nos primeiros meses após a infecção e são geralmente paucibacilares<sup>22</sup>. A tuberculose pleural, é a forma mais comum de doença extra-pulmonar em adultos, ocorrendo em até 20% dos pacientes e representa uma das principais causas de morbidade associada à tuberculose extrapulmonar<sup>23,24</sup>.

A maioria dos casos de tuberculose pulmonar secundária representa reativação de infecção antiga, possivelmente subclínica. Durante a infecção primária, os bacilos podem disseminar-se sem produzir sintomas, estabelecendo-se em locais com alta tensão de oxigênio, sobretudo nos ápices pulmonares. A reativação nesses locais ocorre em 5 a 10% dos casos de infecção primária; a evolução das lesões secundárias também é variável, podendo cicatrizar espontaneamente ou com tratamento ou, progredir de

diferentes maneiras. De modo geral, tende a produzir mais lesões pulmonares do que a doença primária<sup>20</sup>.

Nos países com alta incidência da doença, o acometimento pleural reflete uma alta taxa de infecção primária, enquanto que nos países com baixa incidência, geralmente resulta da reativação de infecções prévias.

Sabe-se que a associação com AIDS dificulta o controle da tuberculose pleural. Em indivíduos imunocompetentes e infectados por *M. tuberculosis*, as chances de que essa infecção evolua para doença são de apenas 10% ao longo da vida<sup>22</sup>.

#### 1.4 Diagnóstico

O aumento no número de novos casos no mundo e o surgimento de cepas multirresistentes aceleraram o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais rápidos e mais sensíveis. O diagnóstico precoce da doença seria extremamente vantajoso do ponto de vista epidemiológico e clínico, uma vez que nas fases iniciais, a doença é menos contagiosa e está associada a menor morbidade e mortalidade.

Embora a cultura do microorganismo continue sendo o método de referência para o diagnóstico, este exame não é suficientemente sensível, tampouco rápido. Em média, dependendo do meio de cultura utilizado, o resultado parcial não é possível antes de duas semanas da semeadura.

A tuberculose pleural também apresenta dificuldades diagnósticas, pois o número de bacilos em amostras de líquido pleural é baixo, com resultados positivos de cultura que não excedem 30%. A presença de granuloma com ou sem necrose caseosa, embora não totalmente específica, é observada em cerca de 80% das espécimes teciduais avaliadas<sup>3</sup>.

Por estes motivos, o diagnóstico de tuberculose pleural quase invariavelmente prescinde do isolamento do agente bacteriano, se limitando ao achado de granuloma no tecido pleural ou à presença de exsudato linfocítico com alto teor protéico e níveis elevados de adenosina deaminase (ADA)<sup>25-28</sup>.

O diagnóstico definitivo de tuberculose requer a detecção do *M. tuberculosis* na amostra biológica através de pelo menos uma das técnicas

microbiológicas atuais: a análise microscópica, o isolamento em cultura ou métodos moleculares<sup>19</sup>.

Entretanto, um dos problemas observados durante as investigações de focos de tuberculose multirresistente foi justamente a identificação tardia do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) em espécimes clínicas. Para superar este problema, especialistas do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) sugeriram recomendações relacionadas aos métodos de identificação das micobactérias, incluindo a utilização de semeadura em meio líquido e sólido para a cultura e um método rápido para identificação do complexo MTB (por exemplo, a sonda de ácido nucléico ou técnica cromatográfica) e relatar esses resultados dentro de 21 dias a contar da recepção da amostra<sup>29</sup>. A tentativa de atingir essa meta representou uma melhoria significativa em muitos laboratórios ao redor do mundo. No entanto, a falta de uniformidade entre os laboratórios e o atraso além dos 21 dias para o diagnóstico definitivo, ainda colocam a tuberculose como uma das doenças de retardo programado de início de terapia e de exposição prolongada dos contactos.

Em diagnóstico de presunção, o resultado de um exame de esfregaço de escarro concentrado e corado para bacilos álcool ácido-resistentes (BAAR) deve ser comunicado dentro de 24 horas da recepção da amostra. Entretanto, tampouco este método é suficientemente sensível ou específico<sup>30</sup>.

Na tuberculose pleural, a cultura do líquido ou do fragmento pleural continua sendo o padrão-ouro para a confirmação diagnóstica. Entretanto, a paucibacilaridade observada no líquido pleural diminui sensivelmente a positividade da baciloscopia e da cultura<sup>23,31</sup>. Também aqui, o longo tempo de incubação necessário para o crescimento do bacilo, que pode chegar a 45 dias, representa uma importante limitação diagnóstica.

Neste sentido, um teste capaz de confirmar ou excluir a doença com rapidez, sensibilidade e especificidade satisfatórias é o que se busca. Nesta direção, foram desenvolvidos testes de amplificação de ácidos nucléicos da micobactéria, dentre eles, a reação em cadeia da polimerase (do inglês, PCR), os quais teoricamente apresentam potencial para atingir esses critérios<sup>29,32</sup>. Em geral, estes testes se utilizam da amplificação de ácidos nucléicos (AAN)

do agente e apresentam boa acurácia, além de possibilitarem um diagnóstico mais precoce<sup>33</sup>. Entretanto, a maioria dos testes de PCR com esta finalidade são validados apenas para espécimes do trato respiratório, portanto, não padronizados para líquido pleural e/ou demais líquidos cavitários.

Conforme mencionado previamente, o diagnóstico precoce permitiria iniciar mais rapidamente a terapia antituberculosa, beneficiando não apenas o paciente, mas também os contactantes. Embora se conheça que os pacientes com baciloscopia de escarro negativa sejam menos infectantes do que aqueles com baciloscopia positiva, a transmissão de TB de um caso fonte baciloscopia negativa pode ocorrer<sup>29</sup>. Um outro benefício acrescentado ao diagnóstico precoce pelos testes de AAN em pacientes com baciloscopia negativa seria, em alguns casos, de se eliminar a prática de procedimentos mais invasivos que além de dispendiosos, acrescentam risco ao paciente, e reduzir o tempo de internação de pacientes hospitalizados<sup>29</sup>.

Neste contexto, o diagnóstico molecular da tuberculose propicia: 1) a detecção rápida e direta do complexo *M. tuberculosis* em espécimes clínicas; 2) a identificação das espécies de micobactérias; 3) a detecção de resistência a drogas, e 4) a tipagem do DNA (ácido desoxirribonucléico) micobacteriano, que permite diferenciar reativação de reinfecção exógena e, desta maneira, rastrear a transmissão, além de afastar possível contaminação laboratorial. Embora estes avanços tecnológicos não substituam os testes convencionais, eles servem como importantes instrumentos complementares na rastreabilidade epidemiológica da doença<sup>34,35</sup>.

Miller et al., em 1988, relataram o primeiro método químico de extração de DNA por precipitação com sal. Na primeira etapa deste método, as células são lisadas e seus debrís são removidos por centrifugação; a seguir, as proteínas são desnaturadas com proteases e removidas com solventes orgânicos. Os solventes orgânicos precipitam as proteínas, que são separadas dos polinucleotídeos (DNA e RNA (ácido ribonucléico)) por centrifugação. Na última etapa, o DNA purificado é normalmente recuperado por precipitação utilizando etanol ou isopropanol. O DNA precipitado é comumente resuspendido em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) ou água bidestilada<sup>36</sup>.

Embora este método seja eficiente e mais viável economicamente, é trabalhoso e demorado, o que levou ao desenvolvimento de colunas de sílica, que se tornaram populares para a extração de ácidos nucleicos em geral, devido à sua conveniência e facilidade de uso. Kits comerciais com colunas de sílica gradualmente se tornaram o novo padrão ouro para a extração de DNA, havendo várias marcas disponíveis no mercado, algumas com capacidade de ligação superiores ao DNA<sup>37</sup>.

Os métodos moleculares apresentam potencial para detectar tanto o *M. tuberculosis* quanto as micobactérias não-tuberculosas, diretamente a partir de amostras clínicas. Mais recentemente, vários métodos baseados em PCR e protocolos específicos de extração de DNA foram incorporados na rotina de laboratórios clínicos para o diagnóstico da tuberculose. Embora existam outros métodos de isolamento de DNA, incluindo lise com detergentes enzimáticos, ruptura mecânica e métodos à base de lise por calor, poucos estudos têm avaliado o tratamento direto de amostras clínicas em bruto, a fim de obter DNA micobacteriano sem descontaminação e/ou demais procedimentos de purificação<sup>35</sup>.

É inegável que os principais beneficiados com a utilização de testes de amplificação de ácidos nucleicos são aqueles cujos espécimes respiratórios, particularmente o escarro e o lavado brocoalveolar, são BAAR negativos<sup>38,39</sup>. Embora a PCR seja um método diagnóstico laboratorial rápido, preciso e específico, ainda apresenta emprego limitado na prática clínica devido ao seu custo e à necessidade de infra-estrutura e pessoal especializado<sup>40</sup>. Os protocolos de amplificação que utilizam metodologia “in house” geralmente são conduzidos por pessoal altamente especializado e dependem de grande esforço de logística para controlar o bem-conhecido problema de contaminação<sup>17,41</sup>. A sequência IS6110 é específica para o complexo *M. tuberculosis*. Esta sequência, que se repete várias vezes no cromossoma da bactéria, foi clonada e utilizada para a detecção do complexo *M. tuberculosis* para estudos epidemiológicos<sup>30,42,43</sup>.

A principal limitação desta técnica são os resultados falsos-negativos (aproximadamente 20%) relacionados com a presença de inibidores da enzima Taq polimerase ou, falsos-positivos, devidos à contaminação da amostra com

DNA de micobactérias ou amplicons de PCR. A nova geração de PCR – a PCR em tempo real, é superior à PCR convencional, pois além de mais sensível e específica, a análise pós-PCR é realizada sem manipulação do produto amplificado<sup>44</sup>.

Os testes moleculares, quando utilizados em amostras de líquido pleural, escarro ou lavado broncoalveolar, apresentam sensibilidades variáveis (11 a 81%)<sup>3,45</sup>. Esta variabilidade se relaciona com o número de bacilos presentes na amostra, com os diferentes métodos de extração, amplificação e detecção do DNA da micobactéria utilizados e da prevalência da doença na população de estudo<sup>3,46</sup>. Além disso, a presença de inibidores intrínsecos à amostra, como teor protéico, presença de hemácias e debris celulares comprometem sobremaneira a positividade da PCR nestes espécimes<sup>5,45,47</sup>.

Ressalta-se que amostras com baciloscopia positiva ou negativa podem apresentar inibição na amplificação do DNA do *M. tuberculosis*, enfatizando o efeito adverso da inibição endógena das amostras sobre a sensibilidade de amplificação do DNA<sup>48</sup>.

A amplificação do DNA de pequenas quantidades do bacilo potencializa a capacidade de detecção do agente, tornando o método mais sensível que a cultura convencional para fins de diagnóstico. Entretanto, a presença de inibidores intrínsecos da amostra (fatores pré-analíticos), associada às técnicas de amplificação e detecção utilizadas (fatores analíticos) podem comprometer a positividade da PCR<sup>5,45,47,49</sup>.

Portanto, a capacidade destes testes para detectar o MTB em amostras clínicas, depende não somente da sequência alvo selecionada, mas também, da eficiência do procedimento de extração do DNA utilizado<sup>47</sup>.

A técnica de PCR tem popularizado o uso da biologia molecular em laboratórios clínicos no diagnóstico de várias doenças infecciosas. No entanto, o desempenho desta técnica depende consideravelmente da qualidade pré-analítica das amostras a serem examinadas. Portanto, seria de grande importância na prática médica, saber a influência da qualidade da amostra no desempenho do teste utilizado bem como, determinar os critérios de aceitabilidade das mesmas<sup>49</sup>.

**OBJETIVO**

---

## 2. OBJETIVO

Considerando os fatores que interferem no desempenho dos testes moleculares, este trabalho visa:

- Avaliar potenciais variáveis pré-analíticas (celularidade, teor protéico e hemorragia) e analíticas (métodos de extração e amplificação/detecção) que podem influenciar a detecção do *M. tuberculosis* em amostras de escarro, lavado broncolaveolar e líquido pleural.

## **MÉTODOS**

---

### 3. MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pleura do Instituto do Coração e nos Laboratórios de Citologia e de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo após aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP sob o número 0587/11 e apoio FAPESP número 11/50842-2.

Como material de estudo foram coletadas amostras de escarro, lavado broncoalveolar e líquido pleural de pacientes sabidamente não infectados pelo *M. tuberculosis*, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

As amostras de escarro induzido foram coletadas de pacientes asmáticos provenientes do Ambulatório de Asma da Disciplina de Pneumologia do HCFMUSP através do procedimento de escarro induzido. As de lavado broncoalveolar (LBA) foram coletadas de pacientes atendidos no Serviço de Broncoscopia do Departamento de Cardiopneumologia do HCFMUSP, principalmente por ingestão de corpo estranho, através de broncoscopia respiratória. Os pacientes não apresentavam suspeita clínica de tuberculose e o resultado das culturas foram todas negativas.

Coletou-se 1200 mL de líquido pleural (LP) de paciente portador de derrame pleural secundário à insuficiência cardíaca congestiva, preenchendo os critérios de transudato pleural. O paciente era sintomático e havia indicação clínica para realização de toracocentese.

As amostras foram submetidas à rotina diagnóstica e à baciloscopia e cultura para confirmação de negatividade de infecção tuberculosa.

Após desmucolização com solução de N-acetil L-cisteína (NALC)-NaOH (hidróxido de sódio) (escarro e LBA), as amostras foram submetidas à contagem de células nucleadas e hemácias e armazenadas em microtubos à temperatura de -80°C para posterior análise.

### 3.1 Preparo das amostras biológicas com as variáveis pré-analíticas

As amostras foram preparadas em grupos de acordo com a concentração de células nucleadas, hemácias e proteínas, potenciais variáveis pré-analíticas de interferência na técnica de PCR. As amostras foram diluídas ou concentradas de maneira a pertencerem às faixas de estudo propostas. O ajuste das concentrações de células e hemácias foi feito com leucócitos e/ou hemácias do sangue periférico dos pacientes.

Para o ajuste do teor protéico utilizou-se albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

No grupo misto, as alíquotas foram ajustadas para conterem as concentrações máximas das variáveis avaliadas, ou seja, mais de 10.000 cels/mm<sup>3</sup>, 4,5 g/dL de proteínas e 50.000 hemácias/mm<sup>3</sup>, que no caso do líquido pleural, se assemelha ao perfil do exsudato tuberculoso (**Tabela 1**).

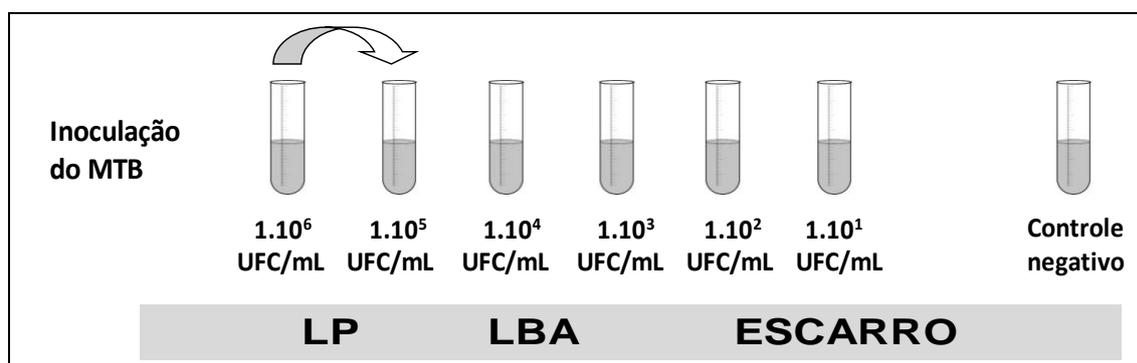
**Tabela 1** – Preparação das amostras biológicas nos grupos de acordo com a concentração das variáveis pré-analíticas avaliadas

| VARIÁVEIS                              | LP       | LBA      | ESCARRO  |
|----------------------------------------|----------|----------|----------|
| Celularidade (cels/mm <sup>3</sup> )   | < 3 000  | < 3 000  | < 3 000  |
|                                        | 10 000   | 10 000   | 10 000   |
|                                        | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 |
| Teor Protéico (g/dL)                   | < 3,0    | ---      | ---      |
|                                        | 4,5      |          |          |
|                                        | > 4,5    |          |          |
| Hemorragia (hemácias/mm <sup>3</sup> ) | < 10 000 | < 10 000 | < 10 000 |
|                                        | 50 000   | 50 000   | 50 000   |
|                                        | > 50 000 | > 50 000 | > 50 000 |
| Misto                                  | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 |
|                                        | > 4,5    | > 50 000 | > 50 000 |
|                                        | > 50 000 |          |          |

### 3.2 Preparação das diluições seriadas de *M. tuberculosis* para inoculação nos tubos testes

Para testar o limiar de detecção do *M. tuberculosis*, os tubos contendo as amostras biológicas nas variadas concentrações das variáveis pré-analíticas foram inoculados com diluições seriadas e decrescentes de unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) da micobactéria.

As cepas de *M. tuberculosis* utilizadas foram isoladas no Laboratório de Microbiologia–DLC-HCFMUSP, a partir de amostras de pacientes do Hospital das Clínicas. Após 30 dias de crescimento, as cepas foram inoculadas em 4mL de caldo de cultura (Middlebrook 7H9, Becton Dickinson, Sparks, MD USA) e tween 0,5%, após homogeneização (2 min) e decantação (20 min) à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para tubo cônico de 15 mL e a amostra foi decantada por 15 minutos. A seguir, foi realizada uma turvação com as cepas em água estéril, até atingir a escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). A partir desta solução, foram realizadas diluições seriadas do agente microbiológico (de  $1,5 \times 10^6$  a  $1,5 \times 10^1$  UFC/mL) para inoculação nos tubos testes, com três repetições para cada diluição. Um tubo sem inoculação da bactéria foi utilizado como controle negativo. As amostras foram submetidas à temperatura de 100°C para garantir a perda de virulência do agente (**Figura 1**).



**Figura 1** - Esquema da inoculação seriada do *M. tuberculosis*

Para confirmar que as diluições seriadas continham o número de micobactérias proposto pela escala de McFarland, determinou-se a quantidade

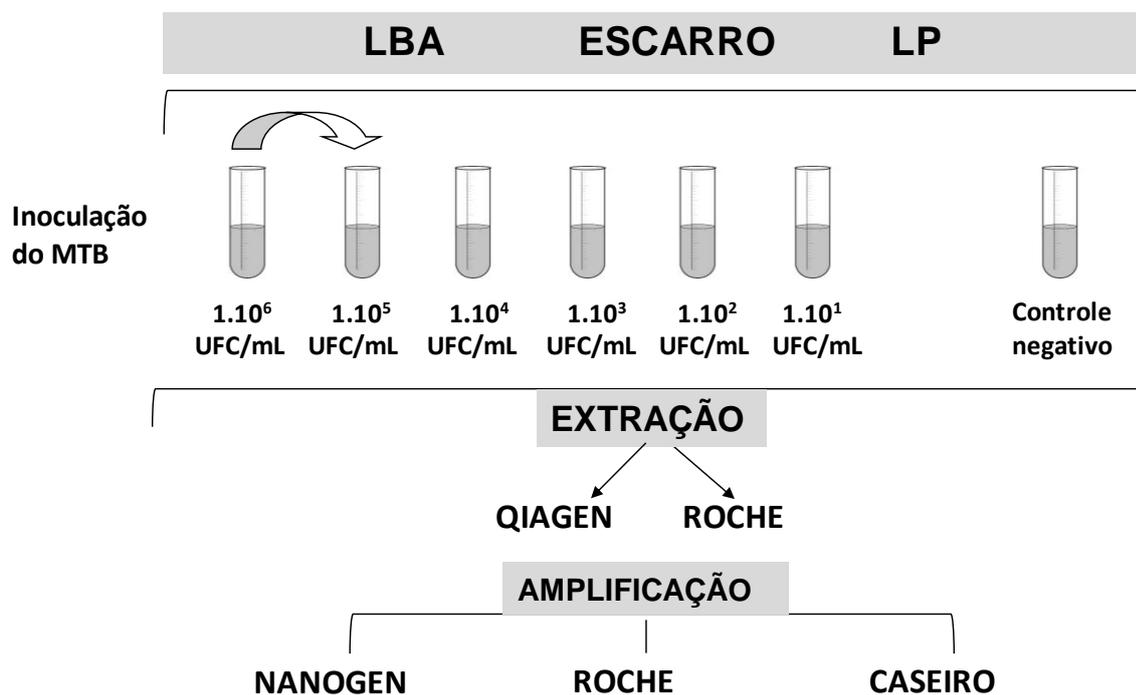
de DNA presente em cada diluição, considerando-se que um microorganismo de *M. tuberculosis* contém aproximadamente 3 fg (fentogramas) de DNA<sup>50</sup>. Foi utilizado o kit Qubit® dsDNA HS Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA) para a quantificação.

Por último, testamos a eficiência da recuperação do *M. tuberculosis* em uma amostra de líquido pleural de paciente com diagnóstico de tuberculose pleural e cujos resultados de baciloscopia e cultura do líquido pleural foram negativos. Em alíquotas dessa amostra foram igualmente inoculadas diluições seriadas da micobactéria ( $1,5 \times 10^6$  a  $1,5 \times 10^1$  UFC/mL), em triplicatas para cada diluição, que foram submetidas à PCR pelas técnicas de extração/detecção abaixo descritas.

### **3.3 Descrição dos métodos de extração e amplificação/detecção utilizados (variáveis analíticas)**

Em todas as amostras, o DNA foi extraído por dois métodos: 1) Método de Extração QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) e 2) AMPLICOR® Respiratory Specimen Preparation (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) e amplificados e detectados por três métodos: 1) COBAS® TaqMan® MTB Test (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA); 2) MTB Q – PCR Alert Kit (Nanogen Advanced Diagnosis, Trezzano, Italy) e 3) *in-house* ou caseiro.

Desta maneira, foram testadas as seguintes combinações: Extração Roche/detecção Roche (R/R); Extração Roche/detecção Nanogen (R/N); Extração Roche/detecção *in-house* (R/IH); Extração Qiagen/detecção Roche (Q/R); Extração Qiagen/detecção Nanogen (Q/N) e Extração Qiagen/detecção *in-house* (Q/IH). O esquema abaixo resume os ensaios utilizados no estudo **(Figura 2)**.



**Figura 2** - Resumo dos ensaios utilizados no estudo

### 3.4 Extração do DNA

As amostras foram submetidas à extração de DNA através dos kits QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) e AMPLICOR® Respiratory Specimen Preparation (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA). O kit QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) utiliza a enzima proteinase K e uma solução detergente para a extração dos materiais biológicos. O material extraído é transferido para uma coluna de sílica e após algumas lavagens está purificado e pronto para ser amplificado.

O kit AMPLICOR® Respiratory Specimen Preparation (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) utiliza primeiramente uma etapa de lavagem para eliminação de interferentes. Em seguida, utiliza uma solução de lise que age a 56°C destruindo a parede do *M. tuberculosis*, seguido do uso de reagente de neutralização para acerto do pH.

### 3.5 Amplificação e Detecção

As amostras foram amplificadas e detectadas pelo método COBAS® TaqMan® MTB Test (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA), MTB Q – PCR Alert Kit (Nanogen Advanced Diagnosis, Trezzano, Italy) e *in-house* ou caseiro<sup>51</sup>, conforme descrição abaixo:

a) O teste COBAS® TaqMan® MTB (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) é um teste de amplificação de ácido nucléico *in vitro* destinado à detecção qualitativa do DNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) em amostras respiratórias humanas liquefeitas, descontaminadas e concentradas, incluindo material de expectoração e lavado broncoalveolar. Este teste realiza a amplificação em tempo real a partir de um par de *primers* e uma sonda marcada com corante fluorescente. Juntos, esses constituintes permitem a detecção do produto amplificado do MTB alvo (*amplicon*) e do DNA do controle interno do *Mycobacterium*, que é amplificado e detectado simultaneamente com a amostra.

O *Master Mix* contém um par de *primers* usado para amplificar uma região específica do cromossoma, e a especificidade para o complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*) é proporcionada por uma sonda de detecção do alvo duplamente marcada. O mesmo par de *primers* é usado para amplificar o DNA do controle interno. A detecção do DNA amplificado é efetuada através de sondas oligonucleotídicas duplamente marcadas específicas para o alvo e específicas para o controle interno, permitindo a identificação independente do amplicon do MTB e do amplicon do controle interno da micobactéria. O genoma do *Mycobacterium* contém uma região altamente conservada de aproximadamente 1.500 nucleotídeos que codificam o gene para o rRNA (RNA ribossômico) 16S. O Teste COBAS® TaqMan® MTB utiliza iniciadores específicos para o gênero *Mycobacterium* por definir uma sequência dentro desta região.

O limite de detecção do Teste COBAS® TaqMan® MTB (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) é de 0,46 UFC/PCR ou aproximadamente 18 UFC/mL, segundo o fabricante.

b) MTB Q – PCR Alert Kit (Nanogen Advanced Diagnosis, Trezzano, Italy) é um ensaio de amplificação de ácidos nucléicos qualitativo para a detecção do DNA do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) em amostras de DNA extraído de escarro, exsudatos e urina.

O processo envolve uma reação de amplificação em tempo real em uma microplaca com aquecimento programável com sistema óptico de detecção de fluorescência (termociclador para o tempo real).

A sonda específica para o MTB é ativada quando se cruza com o produto específico da reação de amplificação de MTB. A sonda específica para o controle interno é ativada quando cruza com o produto da reação de amplificação para a região do gene TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) humano.

A emissão de fluorescência aumenta conforme o aumento na formação de produtos específicos na reação de amplificação, que é medido e registrado pelo aparelho de tempo real da série 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Na reação de amplificação de cada amostra, o ponto onde a reação atinge o limiar da fase exponencial é chamado de *Cycle threshold* ( $C_T$ ) que permite a quantificação exata e reprodutível através da fluorescência emitida. O valor de  $C_T$  da sonda para MTB é usado para detectar a presença do DNA-alvo; o valor de  $C_T$  da sonda do controle interno é usado para validar a detecção, amplificação e extração. Este ensaio tem um limite de detecção de 10 genomas de *M. tuberculosis* por reação.

c) Caseiro: Nesta metodologia a amplificação do alvo ocorre através da reação de polimerização em cadeia (PCR) através dos *primers* IS-1 e IS-2 que definem uma seqüência de 123 pb (pares de base) do segmento IS6110 do DNA da micobactéria.

Utilizamos uma mistura (*master mix*) que contem tampão 10x concentrado (100 mM Tris HCl pH 8,8 e 500 mM KCl) , 50 mM de MgCl<sub>2</sub> (cloreto de magnésio), 2 mM de cada dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100  $\mu$ M de cada *primer* (IS-1 5' CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG 3' e IS-2 5' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 3') e 0,25  $\mu$ L de Taq DNA Polimerase, totalizando um volume final de 15  $\mu$ L. Após a adição da amostra, os tubos são levados para o termociclador, com a

seguinte ciclagem: 94°C por 5 min; 25 ciclos de 2 min a 94° C; 2 min a 68°C; 2 min a 72°C e um ciclo final a 15°C infinito.

O produto da amplificação de 123 pb é visualizado em gel de agarose a 2,0% no transiluminador de luz ultravioleta após ter sido corado com solução de brometo de etídio. O limite de detecção do teste é de 100 UFC/mL.

Todas as amostras foram realizadas em triplicata. Para avaliação da sensibilidade analítica do ensaio, considerou-se a menor detecção obtida simultaneamente nas triplicatas. Em caso de falha de detecção de algum tubo da triplicata, considerou-se o valor de detecção anterior.

Os resultados serão apresentados de maneira descritiva sob a forma de gráficos para melhor visualização dos achados. As tabelas com os conjuntos de dados encontram-se no Apêndice.

**RESULTADOS**

---

## 4. RESULTADOS

A quantidade de DNA testada nos tubos contendo as diluições seriadas do *M. tuberculosis* está demonstrada na Tabela 2. Considerando-se a quantidade de DNA contida em uma micobactéria, as concentrações de DNA obtidas a partir da escala de McFarland corresponderam, em ordem de grandeza, às concentrações quantificadas por espectrofotometria.

**Tabela 2** - Concentrações de *M. tuberculosis* obtidos pela escala de McFarland e quantidade de DNA micobacteriano dosado por espectrofotometria

| Concentração<br>UFC/mL | Quantidade de DNA<br>ng/mL |
|------------------------|----------------------------|
| $1 \times 10^6$        | 5.83                       |
| $1 \times 10^5$        | 0.41                       |
| $1 \times 10^4$        | 0.069                      |
| $1 \times 10^3$        | <0,05                      |
| $1 \times 10^2$        | <0,05                      |
| $1 \times 10^1$        | <0,05                      |

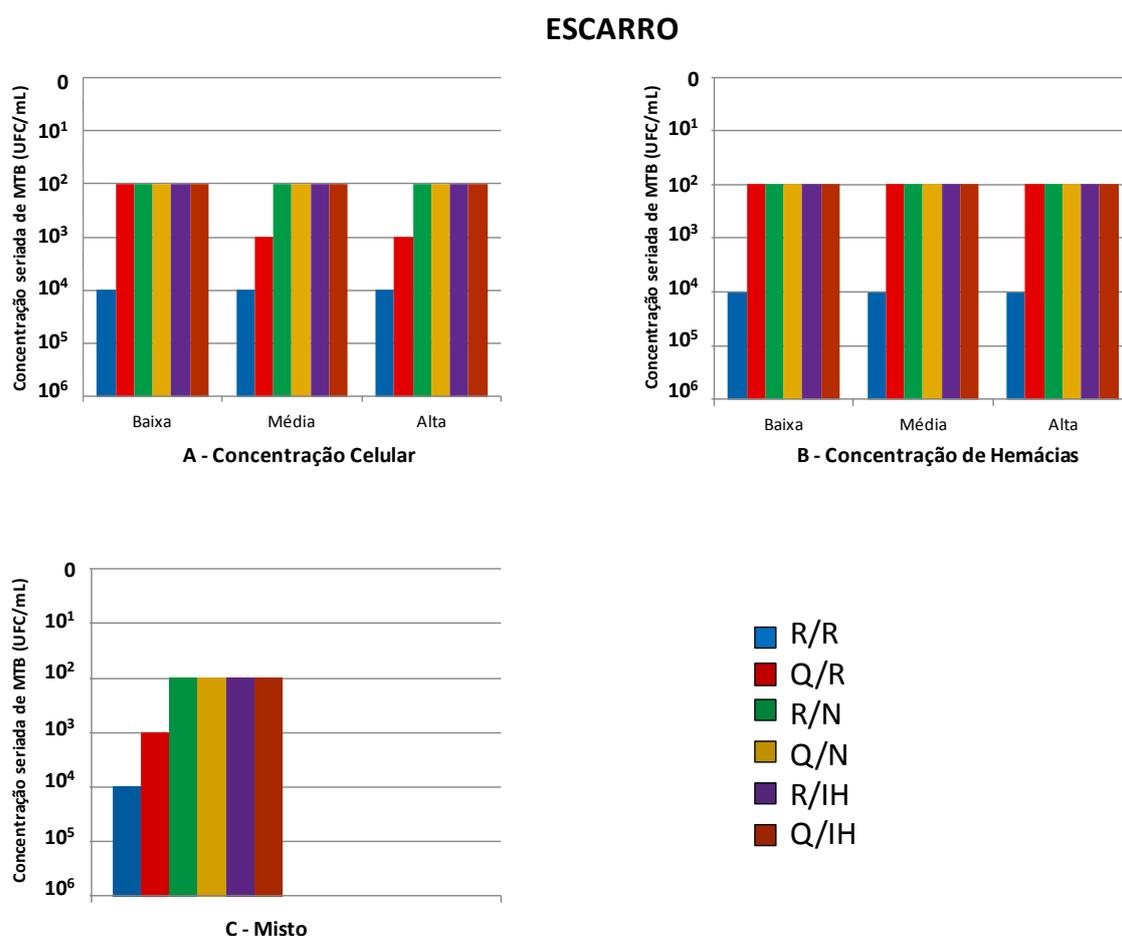
UFC: unidade formadora de colônia

De maneira geral, a detecção até  **$10^4$  UFC/mL** de micobactérias foi possível em todos os tipos de amostras, com todas as combinações de técnicas de extração/detecção utilizadas e independentemente das variáveis pré-analíticas acrescentadas nos tubos testes.

### 4.1 Escarro

Nas amostras de escarro foi possível a detecção de até  **$10^2$  UFC/mL** independentemente da concentração celular com as combinações R/N, Q/N, R/IH e Q/IH. A combinação de extração/detecção Roche forneceu o pior desempenho, tendo detectado apenas até  $10^4$  UFC/mL (**Figura 3A**). Em

contrapartida, avaliando-se a variável hemorragia, a detecção de  $10^2$  UFC/mL somente não foi alcançada quando se utilizou os kits de extração/detecção da marca Roche, independentemente do número de hemácias acrescentado aos tubos testes (**Figura 3B**). No tubo misto (alta concentração celular e de hemácias), a obtenção de  $10^2$  UFC/mL somente foi possível quando se utilizou a técnica de detecção Nanogen ou caseira (**Figura 3C**).



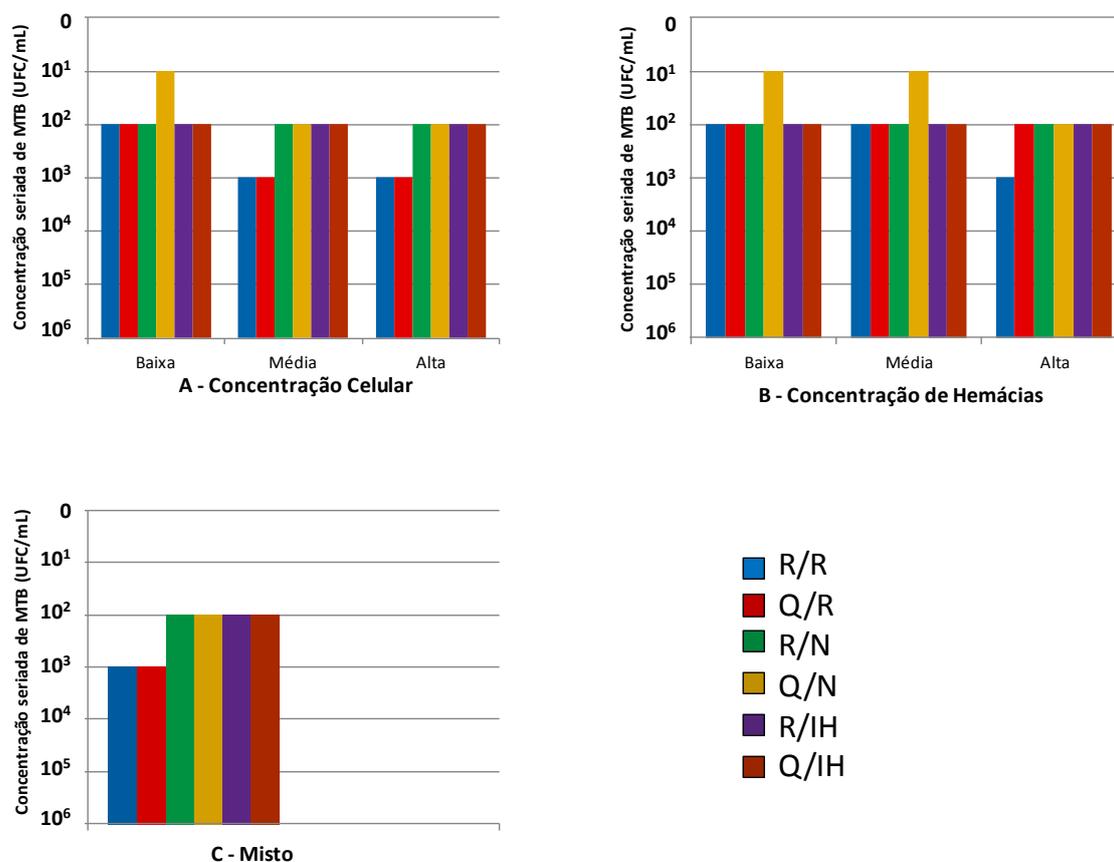
**Figura 3** - Demonstração da detecção de UFC/mL de *M. tuberculosis* em amostras de escarro com diferentes combinações de métodos de extração/detecção, considerando-se os grupos de variáveis pré-analíticas avaliadas

## 4.2 Lavado broncoalveolar

Nas amostras de LBA, observamos que para os casos de baixa concentração celular foi possível detectar até **10<sup>2</sup> UFC/mL** com todas as combinações de técnicas de extração/deteção utilizadas, sendo que com a combinação Qiagen/Nanogen foi possível detectar até **10<sup>1</sup> UFC/mL**. Nos casos de média e alta concentração celular, à exceção da técnica utilizando deteção Roche (**10<sup>3</sup> UFC/mL**), as demais combinações permitiram a deteção de **10<sup>2</sup> UFC/mL (Figura 4A)**. Quando se avaliou a variável hemorragia, os melhores resultados de deteção obtidos ocorreram com a combinação Qiagen/Nanogen (**10<sup>1</sup> UFC/mL**). Nas amostras que continham a maior concentração de hemácias, o desempenho menos satisfatório foi obtido com a combinação R/R, que detectou apenas até **10<sup>3</sup> UFC/mL (Figura 4B)**.

No grupo de LBA misto (alta concentração celular e de hemácias), foi possível a deteção de até **10<sup>2</sup> UFC/mL** nas combinações de técnicas que não utilizaram os kits de extração/deteção Roche (**Figura 4C**).

## LAVADO BRONCOALVEOLAR



**Figura 4** - Demonstração da detecção de UFC/mL de *M. tuberculosis* em amostras de lavado broncoalveolar com diferentes combinações de métodos de extração/detecção considerando-se os grupos de variáveis pré-analíticas avaliadas

### 4.3 Líquido Pleural

No líquido pleural, observamos pouca influência da celularidade na detecção da micobactéria. Foi possível a detecção do *Mycobacterium tuberculosis* até **10<sup>2</sup> UFC/mL** com a maioria das combinações de extração/detecção utilizadas. Para celularidades mais elevadas (>10.000/mm<sup>3</sup>), este nível de detecção (10<sup>2</sup>) não foi obtido com o kit de extração/detecção Roche (**Figura 5A**).

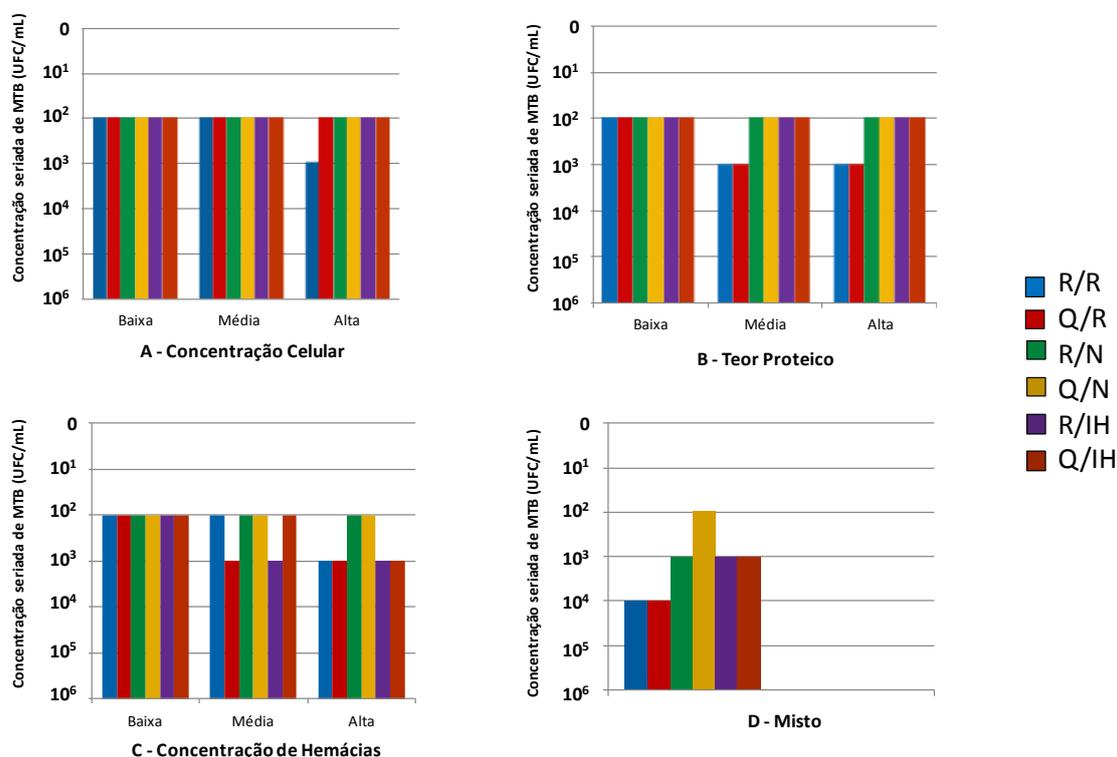
Os resultados obtidos sugerem que médios e altos teores protéicos influenciam no desempenho do teste molecular, particularmente quando se

utilizou o kit de detecção da Roche, observando-se a detecção de até **10<sup>3</sup> UFC/mL**. Nas demais combinações, foi possível a detecção de até **10<sup>2</sup> UFC/mL (Figura 5B)**.

Das variáveis pré-analíticas avaliadas, a concentração de hemácias foi a que isoladamente apresentou maior interferência na detecção da micobactéria. Considerando-se a concentração média de hemácias nas amostras, as combinações Q/R e R/IH detectaram até **10<sup>3</sup> UFC/mL**. Nas amostras que continham > 50.000 hemácias/mm<sup>3</sup>, os melhores resultados de detecção foram obtidos quando utilizamos os métodos de extração/detecção Qiagen e Nanogen, respectivamente, conseguindo a detecção de até **10<sup>2</sup> UFC/mL (Figura 5C)**.

Na amostra de líquido pleural do grupo misto (valores máximos das variáveis pré-analíticas), que se assemelha ao perfil do exsudato pleural tuberculoso, observou-se que apenas a combinação de extração Qiagen/detecção Nanogen permitiu a recuperação de **10<sup>2</sup> UFC/mL (Figura 5D)**.

## LÍQUIDO PLEURAL

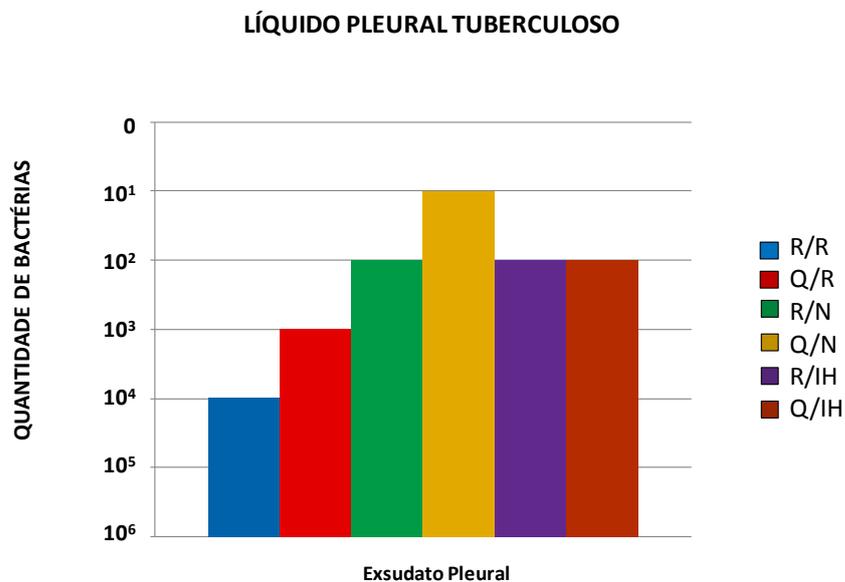


**Figura 5** - Demonstração da detecção de UFC/mL de *M. tuberculosis* em amostras de líquido pleural com diferentes combinações de métodos de extração/detecção, considerando-se os grupos de variáveis pré-analíticas avaliadas

A amostra de líquido pleural de paciente portador de tuberculose pleural apresentou-se como um líquido pleural linfocítico (94% linfócitos, 3% neutrófilos, 2% de monócitos e 1% de plasmócitos) com ADA elevada (57,6 U/L) e cultura e baciloscopia negativas. À biópsia de pleura parietal observou-se processo inflamatório crônico granulomatoso com foco de necrose caseosa, BAAR negativa.

Nesta amostra de exsudato pleural tuberculoso, em apenas um tubo da triplicata foi possível a detecção qualitativa da micobactéria na combinação Q/R. Com a combinação Q/N, a detecção foi observada em dois tubos da triplicata. Nas demais combinações avaliadas, inclusive a combinação utilizada na rotina (R/R) não houve detecção do *M. tuberculosis*.

Nesta amostra, que se assemelha à do grupo misto, ou seja, com os valores mais críticos dos interferentes pré-analíticos, obtivemos melhores resultados de detecção com a combinação de extração Qiagen e detecção Nanogen, que foi de  $10^1$  UFC/mL (Figura 6).



**Figura 6** - Demonstração da detecção de UFC/mL de *M. tuberculosis* em amostra de exsudato pleural de etiologia tuberculosa com diferentes combinações de métodos de extração/detecção

**DISCUSSÃO**

---

## 5. DISCUSSÃO

Escarro, lavado broncoalveolar e líquido pleural são os espécimes biológicos mais comumente encaminhados ao laboratório clínico para diagnóstico de tuberculose. Mimetizando o que ocorre com essas amostras, investigamos a interferência da concentração celular, de hemácias e das proteínas na detecção do *M. tuberculosis*.

No presente estudo, observamos que em amostras de escarro, a quantidade de células e de hemácias não interferiu na detecção do *M. tuberculosis*, exceto quando utilizada a combinação Q/R nas amostras com médias e altas concentrações celulares. Nas amostras de LBA, altas concentrações de células e de hemácias contribuíram para menor detecção da micobactéria com a maioria das combinações utilizadas; nas amostras de LP, a concentração de hemácias foi a variável que isoladamente mais interferiu na detecção, exceto na combinação R/N e Q/N, que apresentou bom desempenho. A concentração celular e o teor proteico apresentaram pouca influência nos métodos de detecção.

O diagnóstico de TB se baseia na detecção do bacilo álcool-ácido resistente por baciloscopia (microscopia) e/ou cultura. A microscopia é rápida, específica e de baixo custo, porém apresenta baixa sensibilidade. A cultura, embora mais sensível, pode demorar várias semanas para que se obtenha o resultado de crescimento e pode ser falsamente negativa em 10-30% dos casos<sup>52</sup>. A falta de testes diagnósticos rápidos e precisos tem sido uma grande preocupação para o controle global da TB. Testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs), que podem gerar resultados em 3-6 horas, foram desenvolvidos e incrementados com o objetivo de melhorar o diagnóstico de TB, quer seja no aspecto de sensibilidade, quer seja no tempo de disponibilização do resultado. Dentre estes testes, a reação em cadeia da polimerase (PCR) se destaca como o mais comum<sup>52</sup>.

Os testes baseados em PCR permitem a detecção laboratorial rápida e confiável do DNA do *M. tuberculosis*, o que é fundamental para diagnóstico e manejo clínico precoce dos pacientes<sup>53</sup>. Previamente ao desenvolvimento e

validação de testes comerciais, a maioria dos laboratórios utilizava a técnica de PCR *in-house*, que são testes baseados em protocolos desenvolvidos no laboratório. Mais recentemente foram desenvolvidos vários NAATs comerciais, cada um com particularidades, especialmente nos métodos de amplificação de regiões específicas do ácido nucleico do complexo *Mycobacterium tuberculosis*<sup>52</sup>.

Atualmente recomenda-se a utilização da PCR em tempo real, que além de ser um teste mais rápido e mais sensível, apresenta maior especificidade, pois apresenta menor chance de contaminação na manipulação das amostras<sup>54</sup>. No entanto, os ensaios disponíveis não foram comparados de forma sistemática. A sensibilidade analítica de grande parte dos testes é relatada apenas em alguns estudos, utilizando-se o resultado da cultura e/ou o diagnóstico clínico como "padrão-ouro"<sup>55</sup>. Entretanto, a falta de um padrão-ouro com alta sensibilidade analítica continua sendo um dos maiores obstáculos para a avaliação de novos testes diagnósticos, especialmente em pessoas infectadas pelo HIV e na doença paucibacilar (como na TB extrapulmonar e na doença pediátrica). A verdadeira precisão dos testes moleculares comerciais pode ser mais elevada do que o relatado, se considerarmos a utilização de padrões de referência imperfeitos<sup>52</sup>.

Em geral, observa-se que a sensibilidade do ensaio de PCR é afetada pelo número absoluto de moléculas de DNA alvo, pelo ambiente complexo das amostras biológicas, pela escassez de microorganismos na amostra e pela complexidade da parede da micobactéria<sup>44,50</sup>.

A presença de inibidores intrínsecos da amostra afeta o mecanismo de amplificação dos *primers* utilizados no ensaio, interferindo nos resultados<sup>56</sup>. Já a complexidade da parede da célula micobacteriana, por ser composta por um envelope multilaminado rico em lipídeos, dificulta a lise celular pelos procedimentos convencionais, prejudicando a exposição do conteúdo genético e, portanto, sua amplificação<sup>57,58</sup>.

Frente aos problemas apresentados com a técnica de PCR, procuramos com este estudo, analisar, de maneira sistemática, a importância de interferentes pré-analíticos usuais no desempenho dos testes moleculares. Para testarmos tal assertiva, simulamos *in vitro*, o que acontece na rotina de

um laboratório de biologia molecular. Amostras de escarro, lavado broncoalveolar e líquido pleural, que são as amostras mais comuns na rotina molecular para diagnóstico de TB, foram preparadas de maneira a conter concentrações crescentes de interferentes e decrescentes de UFC/mL da micobactéria, uma vez que não é incomum estes interferentes impedirem a amplificação da seqüência alvo e com isso, resultarem na não detecção da micobactéria.

De acordo com nossos achados, observamos que quando aumentamos a concentração dos interferentes nas amostras, há uma tendência de menor detecção do *M. tuberculosis*.

Vários estudos abordam a questão dos interferentes pré-analíticos no desempenho da PCR. A fim de simular as condições mais difíceis para a extração e amplificação seletivas do DNA micobacteriano, o estudo de Restrepo et al.<sup>44</sup> utilizou o sangue como modelo, pois o sangue é paucibacilar, tem inibidores internos da enzima Taq polimerase, alguns tão naturais como o heme e o IgG do plasma e outros adicionados durante a coleta, tais como o uso de tubos com anticoagulantes contendo EDTA (quelante de  $Mg^{2+}$ ) ou heparina (liga-se a Taq polimerase). Ademais, no sangue há um excesso de DNA genômico que também pode interferir na amplificação dos alvos. Os autores obtiveram sensibilidade que variou de 33-95%, dependendo do método de extração de DNA e do tipo de teste de PCR utilizado.

Ao avaliarmos se o grau de hemorragia presente em determinada amostra poderia causar alguma inibição ou interferência nas técnicas de PCR utilizadas, observamos que para o LBA e para o LP, a presença de altas concentrações de hemácias condicionou uma menor recuperação da micobactéria. A presença de proteínas no líquido pleural, mesmo em altas concentrações, pouco influenciou na detecção do MTB. Talvez a explicação para o fato seja termos utilizado a albumina bovina (BSA) para mimetizar a presença das proteínas endógenas no líquido pleural. Um artigo publicado por Forbes e Hicks et al.<sup>59</sup> demonstrou que a incorporação de BSA nas reações de amplificação teve um impacto significativo sobre a taxa de inibição nos ensaios de PCR. Com base nos resultados obtidos, os autores sugerem que o BSA poderia anular os efeitos de inibidores endógenos presentes em amostras

respiratórias e conseqüentemente, aumentar a eficiência do ensaio de PCR, podendo ser encarada como uma ferramenta para minimizar tais efeitos em amostras clínicas.

Com relação à concentração celular, observamos em nosso estudo que quando grandes concentrações de células foram adicionadas às amostras de LBA, houve uma menor detecção do *M. tuberculosis*, sugerindo que a presença de excesso de DNA pode interferir na recuperação da micobactéria, conforme também observado por outros autores<sup>60-62</sup>.

Considera-se o método de extração utilizado no ensaio de PCR uma das etapas mais fundamentais para o êxito na detecção do *M. tuberculosis*, pois é nessa etapa que se expõe o conteúdo do DNA genômico. A extração ideal é aquela que consegue romper a barreira lipídica da micobactéria e recuperar pequenas quantidades de DNA puro e isento de inibidores, de maneira a garantir que as reações de amplificação e detecção ocorram sem problemas<sup>57,63</sup>.

O estudo de Suffys et al.<sup>64</sup> avaliou 183 amostras de escarro obtidas de indivíduos com diagnóstico clínico e radiológico de TB pulmonar, sendo que em 80 amostras (44%) a PCR foi positiva. Destas, 35 apresentavam baciloscopia negativa, 29 BAAR +, 10 BAAR ++ e 6 BAAR +++, demonstrando que a positividade da PCR não estava diretamente relacionado com o número de bacilos presentes na amostra. A baixa sensibilidade da PCR em amostras de escarro com baciloscopia positiva (67%), levou os autores a suspeitarem da ocorrência de degradação do DNA micobacteriano durante o processamento do ensaio ou, inibição da reação. Para avaliar se houve realmente inibição, as amostras de escarro foram misturadas com DNA puro de *M. tuberculosis* em uma concentração final de 10 ng/mL e 36 amostras foram ressubmetidas à PCR. A inibição foi avaliada comparando-se a intensidade do produto amplificado com três reações onde não houve adição de DNA. As amostras controle apresentaram rendimento idêntico do produto de PCR. Vinte e duas amostras (61%) apresentaram menor intensidade do produto amplificado ou não houve detecção. Destas, 8/17 foram PCR positivas e apresentavam baciloscopia negativa; 4/7 apresentavam BAAR +, 3/3 BAAR ++ e 7/9 BAAR +++. Os autores concluíram que houve inibição da reação de PCR em um

número significativo de amostras de escarro, ressaltando a importância da escolha do método de extração na eliminação de possíveis interferentes das amostras.

No presente estudo, utilizamos dois diferentes métodos de extração de DNA e de maneira geral, para os 3 tipos de amostras avaliadas, os melhores resultados de detecção foram obtidos quando se utilizou o método de extração Qiagen, independente das condições pré-analíticas das amostras. Neste método, que é baseado em colunas de sílica, o DNA é adsorvido a membranas, superfícies ou partículas de sílica na presença de sais e em pH específico, de maneira que os contaminantes celulares são removidos por etapas de lavagens e o DNA pode ser eluído em um tampão. Como vantagem, o uso das colunas de sílica na etapa de extração melhora o rendimento e o grau de pureza do ácido nucléico obtido.

Realmente observamos diferenças na detecção da micobactéria quando comparamos os dois tipos de extração. Para as amostras de escarro, independente da concentração de células e hemácias, pudemos observar que quando utilizada a combinação R/R a detecção de MTB foi de até  $10^4$  UFC/mL, e quando utilizada a combinação Q/R, a detecção foi de até  $10^2$  UFC/mL para todas as concentrações de hemácias e baixa concentração de células e de até  $10^3$  UFC/mL para as maiores concentrações celulares. Para o LBA, também a extração baseada em coluna de sílica demonstrou o melhor desempenho.

Assim como em nosso trabalho, Amicosante et al.<sup>48</sup> avaliaram diferentes tipos de extração: fenol-clorofórmio, kit GeneReleaser (baseado em coluna de sílica) e a combinação de fenol-clorofórmio com o GeneReleaser. O objetivo do referido estudo foi avaliar se a utilização de coluna de sílica em protocolo de PCR para diagnóstico da tuberculose poderia evitar procedimentos laboratoriais mais demorados, como a extração do DNA com fenol-clorofórmio. Os autores concluíram que a utilização destas colunas pode melhorar significativamente o desempenho dos testes de PCR para o diagnóstico de tuberculose.

Embora utilizando tubos de lise (IDI INFECTIO Diagnostics, Inc.), Aldous et al.<sup>47</sup> reportaram resultados semelhantes aos nossos, inferindo que nessa técnica de extração, ocorre uma maior exposição do DNA micobacteriano pela

ruptura mecânica com *beads* de vidro, permitindo a recuperação de maior quantidade de ácido nucleico, quando comparada a métodos de extração baseados em detergente (como o método da Roche testado em nosso estudo). Segundo os autores, estes últimos não conseguem remover completamente os inibidores de PCR<sup>47,65</sup>.

Também avaliando a importância dos métodos de extração no diagnóstico molecular de TB pleural, Santos et al.<sup>50</sup> avaliaram o rendimento e a presença de inibidores da PCR em DNA extraído por diferentes métodos em amostras de líquido pleural positivas para *M. tuberculosis*. Os autores utilizaram métodos baseados em fenol-clorofórmio, congelamento-descongelamento com ebulição, baseados em detergentes, resina Chelex, QIAmp DNA Mini kit (Qiagen), Roche Cobas TNAI-AMPLI - prep e, finalmente, o kit robô IQ Casework da Promega com Maxwell 16. Dentre os métodos comerciais e os caseiros, verificou-se, surpreendentemente, que apenas três métodos - o DNA QIAmp Mini kit, o CHELEX 100 e o Cobas TNAI-AMPLI-prep foram eficientes para remover os inibidores da PCR e produzir pequenas quantidades detectáveis de DNA do *M. tuberculosis* (<10<sup>2</sup> bacilos)<sup>50,65</sup>, demonstrando que os resultados foram influenciados pela técnica de extração de DNA utilizada.

Até um passado recente, a detecção do *M. tuberculosis* era realizada somente pela técnica caseira ou *in-house* na maioria dos laboratórios de Biologia Molecular. Embora ainda utilizada, esta técnica, além de demorada, apresenta alto risco de contaminação das amostras devido à manipulação dos *amplicons* na área de pós-PCR. Com o desenvolvimento dos kits comerciais, passou-se a utilizar mais globalmente o kit Cobas Amplicor (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA). Neste ensaio, o processo de extração é baseado no uso de detergentes, porém ainda mantém a manipulação dos *amplicons* no pós-PCR. Embora menos demorado e mais sensível que a técnica *in-house*, apresenta maiores taxas de falsos positivos pelo risco de contaminação. Com o desenvolvimento da técnica de PCR em tempo real, o Cobas Amplicor foi sendo substituído pelo Cobas Taqman (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA), atualmente bastante difundido na rotina laboratorial. Este ensaio, por utilizar a técnica de PCR em tempo real, não

apresenta o risco de contaminação com *amplicons*, porém, ainda utiliza o mesmo método de extração do kit Amplicor, que não favorece a eliminação de substâncias interferentes presentes nas amostras. Ambos os ensaios são destinados à detecção qualitativa do DNA do complexo MTB em amostras respiratórias humanas liquefeitas, descontaminadas e concentradas, incluindo amostras obtidas por expectoração e lavados broncoalveolares.

O ensaio da Nanogen (MTB Q – PCR Alert Kit), mais recentemente disponibilizado no mercado, também utiliza PCR em tempo real, porém ainda é pouco utilizado na rotina laboratorial. A vantagem deste ensaio, é que ele permite a detecção do DNA do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) em amostras de escarro, exsudatos e urina, ou seja, em outros tipos de amostras além do trato respiratório, motivo pelo qual optamos por testá-lo em nosso estudo.

Desta maneira, utilizamos no estudo, três diferentes ensaios de detecção: dois deles utilizando-se a técnica de *Real Time*, porém com *primers* e sondas marcadas com fluoróforos diferentes (Roche e Nanogen) e uma terceira, utilizando-se a técnica de PCR convencional, a fim de verificarmos a influência destas metodologias no resultado final do teste.

Para as amostras de escarro, independente da variável pré-analítica acrescentada, a combinação de técnicas Roche (extração/detecção), apresentou o desempenho menos satisfatório; entretanto, a detecção Nanogen apresentou boa sensibilidade, independentemente da técnica de extração utilizada. Para o lavado broncoalveolar os resultados foram semelhantes, embora quando se utilizou a combinação Qiagen/Nanogen os níveis de detecção foram melhores.

Nas amostras de líquido pleural, observamos que com o aumento da celularidade, da concentração de hemácias e de proteínas, a combinação R/R foi a que apresentou pior detecção do *M. tuberculosis*. Resultados semelhantes foram observados com a combinação de extração Qiagen com detecção Roche para o grau de hemorragia e de teor proteico. Entretanto, quando utilizado o kit de detecção da Nanogen, obtivemos melhor desempenho, independentemente do método de extração utilizado e do tipo de amostra analisada. O método de detecção caseiro evidenciou um bom desempenho diagnóstico quando

combinado ao método de extração Qiagen, reforçando a importância da melhor combinação extração/detecção, especialmente quando avaliamos amostras paucibacilares ou, que apresentam baciloscopia negativa.

Ao mimetizarmos o perfil do exsudato pleural tuberculoso (tubos preparados com os valores máximos das variáveis pré-analíticas - grupo misto), somente a combinação de extração Qiagen com detecção Nanogen, demonstrou desempenho ideal. Segundo Nagesh et al.<sup>57</sup>, apesar da PCR ser um método rápido e sensível para a detecção do DNA micobacteriano no líquido pleural, esta técnica deve ser recomendada quando a chance pré-teste de tuberculose é alta e o resultado da baciloscopia de escarro é negativa.

Apesar das referências de literatura serem controversas com relação ao desempenho dos testes de PCR para diagnóstico de tuberculose, os resultados obtidos em nosso estudo demonstram que os três testes utilizados foram capazes de detectar baixas concentrações de *M. tuberculosis* nos três tipos de amostras avaliadas. Entretanto, as menores detecções foram obtidas com o kit de detecção Nanogen, independente do tipo de amostra biológica testada e de maneira geral, quando se utilizou a extração Qiagen.

O teste Cobas TaqMan apresenta boa sensibilidade e especificidade diagnóstica para amostras do trato respiratório quando comparado à cultura, detectando, segundo os fabricantes, até  $10^2$  UFC/mL. O ensaio da Nanogen se mostrou promissor para uso na rotina laboratorial, por ser mais sensível e passível de utilização em amostras além das do trato respiratório.

A literatura não é vasta na avaliação do desempenho do kit da Nanogen em amostras do trato respiratório e em amostras extrapulmonares. No estudo de Mendes et al.<sup>66</sup>, os autores comparam o kit da Nanogen (MTB Q – PCR Alert Kit) com um kit utilizado na rotina do laboratório (Amplified MTD Assay - Genprobe). Os resultados obtidos com o kit Nanogen foram concordantes com os resultados da rotina. Além disso, todas as amostras de controle de qualidade testadas também apresentaram resultados concordantes com os resultados fornecidos pelo painel de controle externo. No entanto, 33% das amostras dos pacientes estudados forneceram resultados inválidos devido à inibição da PCR atribuível à amostra, levando os autores a concluir que o kit MTB Q Alert (Nanogen) apesar de bastante sensível e específico, teve seu

desempenho severamente prejudicado pelo processo de extração do DNA. Embora este trabalho mostre resultados divergentes dos nossos, julgamos procedente considerar a avaliação da detecção do ensaio frente aos diferentes métodos de extração utilizados.

Mais recentemente foi introduzido na rotina laboratorial, o equipamento GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, Califórnia, EUA), que é um teste de PCR em tempo real completamente automatizado, concebido para detectar o *Mycobacterium tuberculosis* e a resistência à rifampicina em 2 h, diretamente das amostras clínicas<sup>67,68</sup>. O equipamento foi lançado em 77 países em 2012, e a maioria dos resultados publicados sugerem que por ser um teste simples, do tipo *point-of-care*, devem auxiliar a enfrentar os casos de tuberculose não diagnosticados, fornecendo um teste simples e rápido<sup>67</sup>.

Ainda existem poucos estudos comparando o ensaio GeneXpert com os demais ensaios de PCR em tempo real para diagnóstico de TB, especialmente para as formas extrapulmonares. Os estudos apresentados até o momento apresentam resultados conflitantes.

Embora o desempenho do GeneXpert MTB/RIF tenha sido mais estudado em amostras de escarro, trabalhos atuais têm avaliado seu desempenho em outros tipos de amostras biológicas, como a de líquidos cavitários<sup>67</sup>. Até o presente momento, há divergências quanto ao uso deste método para a detecção do MTB em amostras extrapulmonares. Segundo Lusiba et al.<sup>69</sup>, o GeneXpert MTB/RIF não deve ser utilizado como teste de avaliação inicial em pacientes com suspeita de tuberculose pleural. Porém, baseado na revisão de Denkinger et al.<sup>70</sup>, a Organização Mundial de Saúde recomenda o GeneXpert MTB/RIF para o diagnóstico da TB ganglionar e de outros tecidos e, como teste inicial preferencial para o diagnóstico de meningite tuberculosa.

Mais recentemente, um estudo de Gascoyne-Binzi et al.<sup>71</sup> avaliou amostras de escarro, lavado broncoalveolar, líquido pleural, tecido, pus, líquor e urina utilizando o ensaio Cepheid GeneXpert® MTB/RIF PCR (GeneXpert) e uma outra alíquota foi extraída utilizando o kit QIAmp DNA Mini kit (Qiagen) e MTB Q-PCR Alert Kit (Nanogen). Quando comparado com a cultura, a sensibilidade e especificidade para o ensaio GeneXpert MTB/RIF foi de 96,2%

e 98,5% e para o ensaio Nanogen, de 92,3% e 92,5%. Quando ajustado para incluir doentes em tratamento, as especificidades dos ensaios foram de 100% e 94%, respectivamente.

Embora esta metodologia não tenha sido contemplada no desenho inicial de nosso estudo, deverá ser objeto de futuras pesquisas, particularmente com amostras outras além de escarro.

### 5.1 Limitações do estudo

Podemos considerar como limitação do estudo, a utilização de amostras preparadas *in vitro* e que, portanto, possam não refletir os problemas de diagnóstico de amostras reais, que passam pela interação do agente microbiano e das células do hospedeiro. Entretanto, optamos por escolher esta metodologia a fim de que pudéssemos controlar as concentrações dos interferentes pré-analíticos nas amostras e com isso, avaliar o comportamento do ensaio de PCR para MTB quanto aos métodos de extração e detecção mais utilizados na rotina laboratorial. Trabalhos semelhantes foram desenvolvidos por outros autores, como Klaschik et al.<sup>72</sup> que desenvolveram um protocolo de PCR em tempo real para triagem de bactérias a partir de amostras preparadas. Este sistema de detecção permite uma classificação exata da coloração de Gram e, em particular, a triagem para espécies específicas de 17 bactérias relevantes para a unidade de terapia intensiva por meio de sondas de hibridação de fluorescência. Uma cepa de cada espécie foi testada a uma densidade final de  $10^6$  UFC/mL. Todas as bactérias examinadas, com exceção de *Staphylococcus aureus* e do *Staphylococcus epidermidis*, puderam ser diferenciadas com sucesso. Os *S. aureus* e *S. epidermidis* só puderam ser classificados como "espécies de *Staphylococcus*".

Os autores Jagodzinski et al.<sup>73</sup>, a partir de amostra de plasma preparada com diferentes concentrações de heparina, avaliaram a concentração ideal de heparina que não levaria à inibição da detecção do HIV por PCR em dois diferentes tipos de equipamentos automatizados. Opel et al.<sup>74</sup> em trabalho semelhante ao nosso, utilizaram diferentes concentrações de inibidores da PCR para determinar a eficiência de amplificação de *primers* específicos,

demonstrando haver uma variedade de mecanismos de inibição durante o processo de PCR e que alguns inibidores podem afetar a reação em mais de uma maneira.

Desta maneira, justificamos a opção de trabalhar com amostras preparadas *in vitro* a fim de se ter controle das várias variáveis (pré-analíticas e analíticas) avaliadas do presente estudo.

**CONCLUSÕES**

---

## 6. CONCLUSÕES

- Reconhecemos que a qualidade da amostra biológica recebida no laboratório clínico pode interferir no desempenho diagnóstico do método molecular. Entretanto, conhecendo os interferentes da amostra, a escolha dos melhores métodos de extração e detecção é de fundamental importância para a garantia de melhores resultados, especialmente quando se trata de amostras paucibacilares e de amostras outras, além do trato respiratório;
- Em nosso estudo obtivemos melhor recuperação do *M. tuberculosis* quando se utilizou o método de extração Qiagen e de detecção Nanogen, independente dos interferentes pré-analíticos acrescentados nas amostras. A combinação de extração Roche e detecção Roche, que é a mais utilizada na rotina laboratorial, apresentou a recuperação menos satisfatória da micobactéria tuberculosa;
- Novos estudos devem ser realizados com amostras biológicas da rotina, utilizando os ensaios de extração/detecção semelhantes ao utilizados no presente estudo, porém, acrescentado o GeneXpert MTB/RIF para ser comparado aos demais ensaios de PCR em tempo real.

## **REFERÊNCIAS**

---

## 7. REFERÊNCIAS

1. Santic Z, Galic K. Epidemiology of tuberculosis during the period 1703-2011: honoring the world tuberculosis day. *Mater Sociomed.* 2013;25(4):291–4.
2. Weyer K. Discovery, innovation, and new frontiers in tuberculosis diagnostics: reflections and expectations. *The Journal of Infectious Disease.* 2015;211(suppl 2):S78–80.
3. Moon JW, Chang YS, Kim SK, Kim YS, Lee HM, Kim SK, Chang J. The clinical utility of polymerase chain reaction for the diagnosis of pleural tuberculosis. *Clinical Infectious Disease.* 2005;41(5):660–6.
4. Zakham F, Lahlou O, Akrim M, Bouklata N, Jaouhari S, Sadki K, Seghrouchni F, Elmzibri M, Benjouad A, Ennaji MM, Elaouad R. Comparison of a DNA based PCR approach with conventional methods for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Morocco. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases.* 2012;4(1).
5. Porcel JM. Tuberculous pleural effusion. *Lung.* 2009;187(5):263–70.
6. Jagielski T, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z. Epidemiology of tuberculosis: a global, European and Polish perspective. *Wiadomosci lekarskie.* 2010;63(3):230–46.
7. Zumla A, George A, Sharma V. WHO's 2013 global report on tuberculosis: Successes, threats, and opportunities. *Lancet.* 2013;382(9907):1765–7.
8. WHO | MDG 6: combat HIV/AIDS, malaria and other diseases World Health Organization. Disponível em:

[http://www.who.int/topics/millennium\\_development\\_goals/diseases/en/](http://www.who.int/topics/millennium_development_goals/diseases/en/).

Acessado em Junho de 2015

9. WHO | Global tuberculosis report 2014. World Health Organization; Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) Acessado em Junho de 2015.
10. WHO | Global strategy and targets for tuberculosis prevention , care and control after 2015. World Health Organization; Disponível em: [http://www.who.int/tb/post2015\\_tbstrategy.pdf/](http://www.who.int/tb/post2015_tbstrategy.pdf/). Acessado em Junho de 2015.
11. Pai M, Schito M. Tuberculosis diagnostics in 2015: Landscape, priorities, needs, and prospects. *The Journal of Infectious Disease*. 2015;211(suppl 2):S21–8.
12. Denkinger CM, Kik SV, Cirillo DM, Casenghi M, Shinnick T, Weyer K, Gilpin C, Boehme CC, Schito M, Kimerling M, Pai M. Defining the needs for next generation assays for tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2015;211(suppl 2):S29–38.
13. Muller BLA, Ramalho DM de P, dos Santos PFG, Mesquita EDD, Kritski AL, Oliveira MM. Inflammatory and immunogenetic markers in correlation with pulmonary tuberculosis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2013;39(6):719–27.
14. World Health Organization, 2012. Global Tuberculosis Report 2012. World Health Organization, Geneva.
15. Brasil. Objetivos de Desenvolvimento do Milênio. Relatório Nacional de Acompanhamento. IPEA 2010.
16. Harling G, Castro MC. A spatial analysis of social and economic determinants of tuberculosis in Brazil. *Health & Place*. 2014;25:56–67.

17. Kibiki GS, Mulder B, van der Ven AJAM, Sam N, Boeree MJ, van der Zanden A, Dolmans WMV. Laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis in TB and HIV endemic settings and the contribution of real time PCR for *M. tuberculosis* in bronchoalveolar lavage fluid. *Tropical Medicine and International Health*. 2007;12(10):1210–7.
18. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Developmental Immunology*. 2011.
19. Delogu G, Sali M, Fadda G. The biology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2013;5(1):Open Journal System
20. Kobzik L. O Pulmão. In: Cotran R, Kumar V, Collins T, editors. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 649–52.
21. Samuelson J. Doenças Infecciosas. In: Cotran R, Kumar V, T C, editors. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 314–5.
22. Seiscento M, Bombarda S. Tuberculose. In: Vargas F, Teixeira LR, Marchi E, editors. *Derrame Pleural*. São Paulo: Roca; 2004. p. 271–84.
23. Sales RKB, Vargas FS, Capelozzi VL, Seiscento M, Genofre EH, Teixeira LR, Antonangelo L. Predictive models for diagnosis of pleural effusions secondary to tuberculosis or cancer. *Respirology*. 2009;14(8):1128–33.
24. Porcel JM, Esquerda A, Vives M, Bielsa S. Etiology of pleural effusions: analysis of more than 3,000 consecutive thoracenteses. *Archivos de Bronconeumologia*. 2014;50(5):161–5.
25. Gopi A, Madhavan SM, Sharma SK, Sahn SA. Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006. *Chest*. 2007;131(3):880–9.

26. Farazi A, Moharamkhani A, Sofian M. Validity of serum adenosine deaminase in diagnosis of tuberculosis. *Pan African Medical Journal*. 2013;15:1–6.
27. Antonangelo L, Vargas FS, Seiscento M, Bombarda S, Teixeira L, Sales RKB. Clinical and laboratory parameters in the differential diagnosis of pleural effusion secondary to tuberculosis or cancer. *Clinics*. 2007;62(5):585–90.
28. Antonangelo L, Vargas FS, Almeida LP, Acencio MMP, Gomes FDM, Sales RK, Seiscento M, Teixeira LR. Influence of storage time and temperature on pleural fluid adenosine deaminase determination. *Respirology*. 2006;11(4):488–92.
29. Woods GL. Molecular methods in the detection and identification of mycobacterial infections. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 1999;123(11):1002–6.
30. Ani A, Okpe S, Akambi M, Ejelionu E, Yakubu B, Owolodun O, Ekeh P, Oche A, Tyem D, Idoko J. Comparison of a DNA based PCR method with conventional methods for the detection of *M. tuberculosis* in Jos, Nigeria. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2009;3(6):470–5.
31. Liu KT, Su WJ, Perng RP. Clinical utility of polymerase chain reaction for diagnosis of smear-negative pleural tuberculosis. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2007;70(4):148–51.
32. Eing BR, Becker A, Sohns A, Ringelmann R. Comparison of Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay with in-house PCR and culture for detection of *M. tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(7):2023–9.
33. Yang YC, Lu PL, Huang SC, Jenh YS, Jou R, Chang TC. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB test for direct detection of *Mycobacterium*

- tuberculosis* complex in respiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011. p. 797–801.
34. Cheng VCC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*. 2005;24(11):711–20.
  35. Gholoobi A, Masoudi-Kazemabad A, Meshkat M, Meshkat Z. Comparison of culture and PCR methods for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in different clinical specimens. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2014;7(2):1–6.
  36. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988;16(3):1215.
  37. Poh J, Gan SK. Comparison of customized spin-column and salt-precipitation finger-prick blood DNA extraction. *Bioscience Reports*. 2014;34(5):629–34.
  38. Min JW, Yoon HI, Park KU, Song JH, Lee CT, Lee JH. Real-time polymerase chain reaction in bronchial aspirate for rapid detection of sputum smear-negative tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2010;14(7):852–8.
  39. Tan YK, Lee ASG, Khoo KL, Ong SYK, Wong SY, Ong YY. Rapid mycobacterial tuberculosis detection in bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction in patients with upper lobe infiltrates and bronchiectasis. *Annals of the Academy of Medicine Singapore*. 1999;28(2):205–8.
  40. Scherer LC, Sperhackle RD, Ruffino-Netto A, Rossetti ML, Vater C, Klatser P, Kritski AL. Cost-effectiveness analysis of PCR for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *BMC Infectious Disease*. 2009;9:216.

41. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, Weber DJ, Miller WC. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(7):3233–40.
42. Flores LL, Pai M, Colford JM, Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiology*. 2005;5:55.
43. Negi SS, Anand R, Pasha ST, Basir SF, Gupta S, Khare S, Lal S. Detection of *M. tuberculosis* in clinical samples of diversified nature by IS6110 based PCR. *Journal of Communicable Disease*. 2006;38(4):325–32.
44. Restrepo BI, Gomez DI, Shipley GL, McCormick JB, Fisher-Hoch SP. Selective enrichment and detection of mycobacterial DNA in paucibacillary specimens. *Journal of Microbiological Methods*. 2006;67(2):220–9.
45. Ben Kahla I, Ben Selma W, Marzouk M, Ferjeni A, Ghezal S, Boukadida J. Evaluation of a simplified IS6110 PCR for the rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in an area with high tuberculosis incidence. *Pathologie Biologie*. 2011;59(3):161–5.
46. Tortoli E, Urbano P, Marcelli F, Simonetti TM, Cirillo DM. Is real-time PCR better than conventional PCR for *Mycobacterium tuberculosis* complex detection in clinical samples? *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(8):2810–3.
47. Aldous WK, Pounder JI, Cloud JL, Woods GL. Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(5):2471–3.

48. Amicosante M, Richeldi L, Trenti G, Paone G, Campa M, Bisetti A, Saltini C. Inactivation of polymerase inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis* DNA amplification in sputum by using capture resin. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995;33(3):629–30.
49. Silva RM, Bazzo ML, Chagas M. Quality of sputum in the performance of polymerase chain reaction for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2009;14(1):116–20.
50. Santos A, Cremades R, Rodríguez JC, García-Pachón E, Ruiz M, Royo G. Comparison of methods of DNA extraction for real-time PCR in a model of pleural tuberculosis. *APMIS*. 2010;118(1):60–5.
51. Eisenach KD, Cave D CJ. PCR Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC WT, editor. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1993. p. 191–6.
52. Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: Meta-analysis and meta-regression. *PLoS One*. 2008;3(2).
53. Bloemberg GV, Voit A, Ritter C, Deggim V, Böttger EC. Evaluation of Cobas TaqMan MTB for direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in comparison with Cobas Amplicor MTB. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(7):2112–7.
54. Cho SY, Kim MJ, Suh JT, Lee HJ. Comparison of diagnostic performance of three real-time PCR kits for detecting *Mycobacterium* species. *Yonsei Medical Journal*. 2011;52(2):301–6.
55. Akkerman OW, Van Der Werf TS, De Boer M, De Beer JL, Rahim Z, Rossen JWA, Soolingen D, Kerstjens HAM, van der Zanden AGM. Comparison of 14 molecular assays for detection of *Mycobacterium*

- tuberculosis* complex in bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(11):3505–11.
56. Kumar M, Sharma S, Ram AB, Khan IA. Efficient mycobacterial DNA extraction from clinical samples for early diagnosis of tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*. 2010;14(7):847–51.
  57. Nagesh BS, Sehgal S, Jindal SK, Arora SK. Evaluation of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pleural fluid. *Chest*. 2001;119(6):1737–41.
  58. Thakur R, Sarma S, Goyal R. Comparison of DNA extraction protocols for *Mycobacterium tuberculosis* in diagnosis of tuberculous meningitis by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2011;3(4):353–6.
  59. Forbes BA, Hicks KE. Substances interfering with direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by PCR: effects of bovine serum albumin. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996;34(9):2125–8.
  60. Hu Q, Liu Y, Yi S, Huang D. A comparison of four methods for PCR inhibitor removal. *Forensic Science International: Genetics*. 2015;16:94–7.
  61. Krämer F, Vollrath T, Schnieder T, Epe C. Improved detection of endoparasite DNA in soil sample PCR by the use of anti-inhibitory substances. *Veterinary Parasitology*. 2002;108(3):217–26.
  62. Witt DJ, Kemper M. Techniques for the evaluation of nucleic acid amplification technology performance with specimens containing interfering substances: Efficacy of Boom methodology for extraction of HIV-1 RNA. *Journal of Virological Methods*. 1999;79(1):97–111.

63. De Almeida IN, Carvalho WS, Rossetti ML, Costa ERD, De Miranda SS. Evaluation of six different DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by means of PCR-IS6110: preliminary study. *BMC Research Notes*. 2013;6:561.
64. Suffys P, Vanderborght PR, Santos PB, Correa LAP, Bravin Y, Kritski AL. Inhibition of the polymerase chain reaction by sputum samples from tuberculosis patients after processing using a silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001;96(8):1137–9.
65. Leung ETY, Zheng L, Wong RYK, Chan EWC, Au TK, Chan RCY, Lui G, Lee N, Ip M. Rapid and simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and Beijing/W Genotype in sputum by an optimized DNA extraction protocol and a novel multiplex real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(7):2509–15.
66. Mendes AC, Fernandes SJ, Ferreira LC, Pereira M, Ramos H, Cabeda JM. Evaluation of MTB Q Alert kit for detection of *Mycobacterium tuberculosis* directly on patient samples. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009. p. S366.
67. Bunsow E, Ruiz-Serrano MJ, López Roa P, Kestler M, Viedma DG, Bouza E. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in clinical specimens. *Journal of Infection*. 2014;68(4):338–43.
68. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014;1(1):CD009593.
69. Lusiba JK, Nakiyingi L, Kirenga BJ, Kiragga A, Lukande R, Nsereko M, Ssenooba W, Katamba A, Worodria W, Joloba ML, Mayanja-Kizza H. Evaluation of Cepheid's Xpert MTB/RIF test on pleural fluid in the

- diagnosis of pleural tuberculosis in a high prevalence HIV/TB setting. *PLoS One*. 2014;9(7):10–5.
70. Denkinger CM, Schumacher SG, Boehme CC, Dendukuri N, Pai M, Steingart KR. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal*. 2014. p. 435–46.
  71. Gascoyne-Binzi D, Robinson G, English A, Collyns T. Comparison of on-demand PCR testing for *Mycobacterium tuberculosis* with culture and batched PCR. *22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*. 2012.
  72. Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, Book M, Gebel J, Stuber F. Detection and differentiation of in vitro-spiked bacteria by real-time pcr and melting-curve analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(2):512–7.
  73. Jagodzinski LL, Weston HR, Liu Y, O'Connell RJ, Peel SA. Efficient quantification of HIV-1 in heparin plasma spiked with cultured HIV-1 by the Roche Cobas Taqman and Abbott Realtime HIV-1 tests. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(8):2804–6.
  74. Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of Forensic Science*. 2010;55(1):25–33.

**ANEXOS**

---

## ANEXO A

### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

#### MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

---

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: .M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO:..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO:..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)  
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M  F

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

---

#### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA . Análise de interferentes na extração, amplificação e detecção de *M. tuberculosis* por reação de PCR em amostras de líquido pleural, escarro e lavado broncoalveolar

PESQUISADOR : Profa. Dra. Leila Antonagelo.....

CARGO/FUNÇÃO: Médica Chefe..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 37439.....

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Citologia – DLC e Laboratório de Doenças Pleurais HCFMUSP.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

X

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos.....

## **HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): **o objetivo deste estudo é avaliar interferentes nas amostras de escarro, líquido pleural e lavado broncoalveolar no resultado final para a definição do diagnóstico**

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros; **Não se aplica**

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos;

**Para saber a causa da doença é necessário realizar alguns procedimentos antes da execução dos exames, como por exemplo, indução de escarro, retirada de líquido pleural e lavado broncoalveolar.**

**1- Para tirar uma quantidade de líquido pleural utilizamos uma agulha fina e seringa para injeção nas costas (tórax) de um remédio líquido que diminui a dor (anestesia) e possibilita que uma agulha mais grossa possa ser colocada nas costas, para a retirada do líquido;**

**2- Para realizar o escarro induzido faz-se a coleta de escarro eliminado após inalação de uma solução salina, que será analisado posteriormente em relação à quantidade e tipos de células encontrados;**

**3- Para retirada do Lavado Broncoalveolar um médico pneumologista irá borrifar um anestésico na boca ou garganta do paciente, em seguida, é inserido um tubo. Este procedimento poderá causar tosse no início, que irá desaparecendo à medida que o anestésico começar a fazer efeito. Quando a área estiver anestesiada o broncoscópio será inserido até passar pela garganta e penetrar o brônquio. Alguns frascos são conectados a um pequeno equipamento, que suga e recolhe os fluidos dos brônquios.**

Todo o material retirado (líquido pleural, escarro e lavado broncoalveolar) será armazenado para exames. O material que sobrar, que seria jogado fora, será guardado para que possamos realizar alguns novos exames e pesquisas para descobrir novas formas de diagnóstico e tratamento.

Estou ciente que este material (líquido pleural, escarro e lavado broncoalveolar) guardado, por ter sobrado, poderá ser utilizado para realização de novos exames ou pesquisas, relacionadas ou não ao meu tratamento, preservando a minha privacidade e o sigilo de minha identidade. Considero que fui devidamente esclarecido. Concordo com os procedimentos acima descritos que eventualmente sobrem após a realização dos exames para diagnóstico e tratamento de minha doença.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

### **Descritos no item 3**

5 – Benefícios para o participante (Por exemplo: Não há benefício direto para o participante... Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que..... Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício...;

**Não há benefício direto nesta fase do estudo. Após a conclusão do estudo, poderemos verificar a presença de algum benefício.**

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar;

### **Não se aplica**

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são Dra. Leila Antonangelo **no endereço Laboratório de Citologia, 2º andar, bloco 12 do Prédio dos Ambulatórios. Telefone(s) 2661-6179 e Gabriela Gaspar Carnevale que pode ser encontrado no endereço Laboratório de Biologia Molecular, 2º andar, bloco 4 do Prédio dos Ambulatórios. Telefone(s) 2661-7275 ou 2661-6178** Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua

Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20,  
FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: [cappesq@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq@hc.fm.usp.br)

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Análise de interferentes na extração, amplificação e detecção de *M. tuberculosis* por reação de PCR em amostras de líquido pleural, escarro e lavado broncoalveolar”

Eu discuti com o Dra Leila Antonangelo sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

-----

Assinatura do paciente/representante legal Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----

Assinatura da testemunha Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----

Assinatura do responsável pelo estudo Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## ANEXO B



Hospital das Clínicas da FMUSP  
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa  
**CAPPesq**

**Nº Protocolo: 0587/11**

**Título:** ANÁLISE DE INTERFERENTES NA EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO DE M. TUBERCULOSIS POR REAÇÃO DE PCR EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO PLEURAL ESCARRO E LAVADO BRONCOALVEOLAR

**Pesquisador Responsável:** Profa. Dra. Leila Antonangelo

**Pesquisador Executante:** Gabriela Gaspar Carnevale

**Finalidade Acadêmica:** Doutorado

**Departamento:** COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** na sessão datada de 31/08/2011 o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 31 de Agosto de 2011.

**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
Coordenador  
Comissão de Ética para Análise de  
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

COMISSÃO CIENTÍFICA  
RECEBIDO  
05/09/2011  
Debara

# APÊNDICE

---

**Tabela 1:** Comparação entre os diferentes grupos de amostras de escarro com diferentes combinações de métodos de extração e detecção

| Variáveis<br>Pré-analíticas               |                 | Extração Roche<br>Detecção Roche | Extração Qiagen<br>Detecção Roche | Extração Roche<br>Detecção Nanogen | Extração Qiagen<br>Detecção Nanogen | Extração Roche<br>Detecção caseira | Extração Qiagen<br>Detecção caseira |
|-------------------------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Celularidade<br>(cels/mm <sup>3</sup> )   | < 3.000         | 10 <sup>4</sup> UFC/mL           | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>      | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
|                                           | 3.000 a 10.000  | 10 <sup>4</sup> UFC/mL           | 10 <sup>3</sup> UFC/mL            | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
|                                           | >10.000         | <b>10<sup>4</sup> UFC/mL</b>     | 10 <sup>3</sup> UFC/mL            | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        |
| Hemorragia<br>(hemácias/mm <sup>3</sup> ) | 5 a 10.000      | 10 <sup>4</sup> UFC/mL           | 10 <sup>2</sup> UFC/mL            | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
|                                           | 10.000 a 50.000 | 10 <sup>4</sup> UFC/mL           | 10 <sup>2</sup> UFC/mL            | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
|                                           | >50.000         | <b>10<sup>4</sup> UFC/mL</b>     | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>      | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        |
| Celularidade (cels/mm <sup>3</sup> )      | >10.000         | 10 <sup>4</sup> UFC/mL           | 10 <sup>3</sup> UFC/mL            | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        |
| Hemorragia (hemácias/mm <sup>3</sup> )    | >50.000         |                                  |                                   |                                    |                                     |                                    |                                     |

**Tabela 2:** Comparação entre os diferentes grupos de amostras de lavado broncolaveolar com diferentes combinações de métodos de extração e detecção

| Variáveis<br>Pré-analíticas               |                 | Extração Roche<br>Detecção Roche | Extração Qiagen<br>Detecção Roche | Extração Roche<br>Detecção Nanogen | Extração Qiagen<br>Detecção Nanogen | Extração Roche<br>Detecção caseira | Extração Qiagen<br>Detecção caseira |
|-------------------------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Celularidade<br>(cels/mm <sup>3</sup> )   | < 3.000         | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>     | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>      | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | <b>10<sup>1</sup> UFC/mL</b>        | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
|                                           | 3.000 a 10.000  | 10 <sup>3</sup> UFC/mL           | 10 <sup>3</sup> UFC/mL            | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
|                                           | >10.000         | 10 <sup>3</sup> UFC/mL           | 10 <sup>3</sup> UFC/mL            | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        |
| Hemorragia<br>(hemácias/mm <sup>3</sup> ) | 5 a 10.000      | 10 <sup>2</sup> UFC/mL           | 10 <sup>2</sup> UFC/mL            | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>1</sup> UFC/mL              | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
|                                           | 10.000 a 50.000 | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>     | 10 <sup>2</sup> UFC/mL            | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | <b>10<sup>1</sup> UFC/mL</b>        | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
|                                           | >50.000         | 10 <sup>3</sup> UFC/mL           | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>      | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        |
| Celularidade (cels/mm <sup>3</sup> )      | >10.000         | 10 <sup>3</sup> UFC/mL           | 10 <sup>3</sup> UFC/mL            | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        |
| Hemorragia (hemácias/mm <sup>3</sup> )    | >50.000         |                                  |                                   |                                    |                                     |                                    |                                     |

**Tabela 3:** Comparação entre os diferentes grupos de amostras de líquido pleural com diferentes combinações de métodos de extração e detecção

| Variáveis<br>Pré-analíticas                                                                       |                             | Extração Roche<br>Detecção Roche | Extração Qiagen<br>Detecção Roche | Extração Roche<br>Detecção Nanogen | Extração Qiagen<br>Detecção Nanogen | Extração Roche<br>Detecção caseira | Extração Qiagen<br>Detecção caseira |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Celularidade<br>(cels/mm <sup>3</sup> )                                                           | < 3.000                     | 10 <sup>2</sup> UFC/mL           | 10 <sup>2</sup> UFC/mL            | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
|                                                                                                   | 3.000 a 10.000              | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>     | 10 <sup>2</sup> UFC/mL            | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
|                                                                                                   | >10.000                     | 10 <sup>3</sup> UFC/mL           | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>      | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        |
| Proteína<br>(g/dL)                                                                                | < 3,0                       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>     | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>      | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
|                                                                                                   | 3,0 a 4,5                   | 10 <sup>3</sup> UFC/mL           | 10 <sup>3</sup> UFC/mL            | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
|                                                                                                   | > 4,5                       | 10 <sup>3</sup> UFC/mL           | 10 <sup>3</sup> UFC/mL            | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        |
| Hemorragia<br>(hemácias/mm <sup>3</sup> )                                                         | 5 a 10.000                  | 10 <sup>2</sup> UFC/mL           | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>      | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
|                                                                                                   | 10.000 a 50.000             | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>     | 10 <sup>3</sup> UFC/mL            | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              | 10 <sup>3</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
|                                                                                                   | >50.000                     | 10 <sup>3</sup> UFC/mL           | 10 <sup>3</sup> UFC/mL            | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>       | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        | 10 <sup>3</sup> UFC/mL             | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        |
| Celularidade (cels/mm <sup>3</sup> )<br>Proteína (g/dL)<br>Hemorragia (hemácias/mm <sup>3</sup> ) | >10.000<br>> 4,5<br>>50.000 | 10 <sup>4</sup> UFC/mL           | 10 <sup>4</sup> UFC/MI            | 10 <sup>3</sup> UFC/mL             | <b>10<sup>2</sup> UFC/mL</b>        | 10 <sup>3</sup> UFC/mL             | 10 <sup>3</sup> UFC/mL              |

**Tabela 4:** Comparação as diferentes combinações de métodos de extração e detecção para uma amostra MTB positiva

| Variáveis<br>Pré-analíticas            |         | Extração Roche<br>Detecção Roche | Extração Qiagen<br>Detecção Roche | Extração Roche<br>Detecção Nanogen | Extração Qiagen<br>Detecção Nanogen | Extração Roche<br>Detecção caseira | Extração Qiagen<br>Detecção caseira |
|----------------------------------------|---------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Celularidade (cels/mm <sup>3</sup> )   | >10.000 | 10 <sup>4</sup> UFC/mL           | 10 <sup>3</sup> UFC/mL            | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>1</sup> UFC/mL              | 10 <sup>2</sup> UFC/mL             | 10 <sup>2</sup> UFC/mL              |
| Proteína (g/dL)                        | > 4,5   |                                  |                                   |                                    |                                     |                                    |                                     |
| Hemorragia (hemácias/mm <sup>3</sup> ) | >50.000 |                                  |                                   |                                    |                                     |                                    |                                     |