

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**COMPARAÇÃO DE DUAS METODOLOGIAS MOLECULARES PARA O
DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE**

KAREN BARROS SCHMID

Porto Alegre, agosto de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

KAREN BARROS SCHMID

**COMPARAÇÃO DE DUAS METODOLOGIAS MOLECULARES PARA O
DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular da
UFRGS como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti

Porto Alegre, agosto de 2014.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente estudo foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), tendo recebido financiamento dos mesmos.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Dra. Maria Lucia Rossetti, a quem tenho enorme respeito e admiração pelo exemplo de pesquisadora e pessoa, minha eterna gratidão pela confiança, dedicação, carinho e por todas as oportunidades. Muito obrigada por tudo!

Um agradecimento muito especial, à minha grande amiga e super dupla de trabalho, Regina Barcellos, pela paciência, enorme empenho e dedicação em me ajudar sempre. És um exemplo pra mim e uma pessoa que quero ter sempre por perto! Muito obrigada!

À querida Tatiana Gregianini, pela ajuda com os experimentos de PCR em tempo real. Muito obrigada por todos os ensinamentos, pelos "empréstimos" de materiais e grande ajuda na realização deste trabalho.

Às minhas colegas, que se tornaram grandes amigas, Mariana Milano e Tatiane Coelho. Muito obrigada por todo apoio e pela grande ajuda durante este percurso! Agradeço por ter tido o privilégio de ter colegas como vocês!

À minha querida amiga e ex-colega, Mirela Verza, pela ajuda inicial e incentivo, que foram de imensa importância para mim.

Às minhas colegas e amigas queridas, Cintia Costi e Carolina Gusatti, pela imensa disposição em ajudar sempre com os experimentos de PCR em tempo real e em todas as minhas dúvidas. Muito obrigada!

À colega e querida amiga, Elis Dalla Costa, por ser tão solícita e estar sempre disponível para ajudar. Obrigada!

À amiga especial, Martinha Loro, agradeço pelo incentivo, amizade e toda a ajuda burocrática!

A todos os colegas do CDCT, pelo excelente ambiente de trabalho. Agradeço muito por toda ajuda e estímulo! Vocês moram no meu coração.

Ao grupo de professores do PPGBCM, especialmente à comissão de acompanhamento deste trabalho, Dra. Marilene Vainstein e Dr. Arnaldo Zaha. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados, disponibilidade e apoio.

Aos secretários do PPGBCM, Silvia Centeno e Luciano Saucedo. Muito obrigada pelo grande auxílio e empenho em ajudar sempre. Vocês são mais que queridos!

À minha família, meus pais Cristina e Ronaldo, e minha irmã Júlia. Sei que mesmo não me entendendo por vezes, sempre me apoiaram e incentivaram. Obrigada pelo suporte, amor incondicional e exemplo de pessoas. Amo muito vocês!

Ao meu amor, Rober Rosso, pela compreensão e incentivo. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado, simplificando minhas angústias e problemas. Te amo muito!

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO.....	10
<i>ABSTRACT</i>	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 A tuberculose.....	12
1.2 O diagnóstico convencional e o diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar.....	16
2.JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4. MANUSCRITO: “Comparison of two molecular methodologies for the diagnosis of tuberculosis”.....	22
5. DISCUSSÃO	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
Apêndice 1 – Instruções para os autores (Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz).....	66
Apêndice 2 – Currículo <i>vitae</i> resumido.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
BCG	Bacilo Calmetti-Guérin
CDCT	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
C_T	<i>Threshold cycle value</i>
DR	<i>Direct repeat elements</i>
ETR	<i>Exact tandem repeat</i>
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
FN	Falso-negativas
FP	Falso-positivas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IS	<i>Insertion sequences</i>
MPTR	<i>The polymorphic GC-rich tandem repeat sequences</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGRS	<i>The major polymorphic tandem repeat sequences</i>
rRNA	RNA ribossomal
SE	Sensibilidade
SP	Especificidade
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose

US FDA *Food and Drug Administration of the United States*

VPN Valor predictivo negativo

VPP Valor predictivo positivo

WHO *World Health Organization*

RESUMO

Considerando as limitações do diagnóstico convencional da tuberculose (TB) e o avanço das tecnologias de diagnóstico, nosso grupo desenvolveu o ensaio *in house* TaqMan-IS6110 para a detecção do DNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. O objetivo deste estudo foi determinar a acurácia do Detect-TB e do ensaio TaqMan-IS6110 em comparação com os métodos de diagnóstico padrão ouro para a TB e o desfecho clínico. Um total de 216 amostras clínicas de escarro espontâneo de pacientes com suspeita de TB foram incluídas. A sensibilidade (SE) e especificidade (SP) do Detect-TB em comparação com a baciloscopia e/ou cultura (n= 109) foram de 89,4% e 70,4%. A SE e SP do Detect-TB em comparação com o desfecho clínico (n= 197) foram de 86,6% e 66,4%. A SE e SP do ensaio TaqMan-IS6110 em comparação com a baciloscopia e/ou cultura (n= 109) foram 92,1% e 62,0%. A SE e SP do ensaio TaqMan-IS6110 em comparação com o desfecho clínico (n= 197) foram de 93,3% e 55,5%. A concordância entre os testes foi demonstrada pelo índice Kappa de 0,56 ($P < 0,001$) (n= 197). O Detect-TB e o ensaio TaqMan-IS6110 apresentaram valores de SE consistentes e SP inferiores quando comparados com outros testes moleculares *in house* e kits comerciais. O ensaio TaqMan-IS6110 deve ser avaliado com um maior número amostral para poder ser validado e para, eventualmente, poder ser implementado comercialmente.

ABSTRACT

Considering the limitations of conventional tuberculosis (TB) diagnosis and the advancement of diagnostic technologies, our group developed an in house IS6110-TaqMan assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA. The aim of the study was to determine the accuracy of the commercial molecular diagnostic assay Detect-TB and the IS6110-TaqMan assay compared to the TB gold standard diagnostic methods and the clinical outcome. A total of 216 clinical specimens of spontaneous sputum from TB suspected patients were included. Detect-TB sensitivity (SE) and specificity (SP) compared with the smear microscopy and/or culture (n= 109) were 89.4% and 70.4%. Detect-TB SE and SP compared with the clinical outcome (n= 197) were 86.6% and 66.4%. IS6110-TaqMan assay SE and SP compared with the smear microscopy and/or culture (n= 109) were 92.1% and 62.0%. IS6110-TaqMan assay SE and SP compared with the clinical outcome (n= 197) were 93.3% and 55.5%. The concordance among the tests were demonstrated by the Kappa index of 0.56 ($P < 0.001$) (n= 197). IS6110-TaqMan assay and Detect-TB showed consistent SE and lower SP when compared with other current molecular in house and commercial kits. IS6110-TaqMan assay should be evaluated with a larger number of samples to be validated and may eventually be implemented commercially.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa, que tem como agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis*. É descrita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um grande problema de saúde pública e que necessita de medidas urgentes. Atualmente, um terço da população mundial está infectada pelo bacilo da TB de forma latente e 10% destas pessoas irão desenvolver a doença ativa em algum momento da sua vida. Apesar dos esforços globais para controlar a TB, a doença ainda representa um desafio considerável para a saúde pública. A TB é a segunda causa de morte devido a um único agente infeccioso, ficando apenas atrás do HIV/AIDS (WHO, 2014 a). Em 2012, 1,3 milhões de pessoas morreram de TB, incluindo 320 000 entre pessoas HIV-positivas (WHO, 2014 b). No Brasil, a cada ano, são notificados, aproximadamente, 70 mil novos casos e ocorrem cerca de 4,6 mil mortes em decorrência da doença. O Brasil ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de TB no mundo (BRASIL, 2014). A prevalência de TB no Brasil, em 2012, foi de 59 para cada 100 000 habitantes. No mesmo ano, um total de 71 230 novos casos, sem tratamento anterior, foram notificados. Incluindo os casos de tratamento anterior mal-sucedido, abandono de tratamento, entre outros, foram notificados cerca de 82 755 casos no ano de 2012 (WHO, 2014 b). No Rio Grande do Sul, foram notificados 6 646 casos da doença em 2012, sendo 4 933 casos novos (CEVS/RS, 2013).

No ano de 1882, em Berlim, Robert Koch isolou e identificou o agente causador da TB, *Mycobacterium tuberculosis*, e estabeleceu a natureza infecciosa da doença por ele causada, abrindo assim o caminho para o combate à TB. Dessa forma, em homenagem ao seu descobridor, essa bactéria, de formato bacilar, também ficou conhecida como bacilo de Koch (PALOMINO *et al.*, 2007).

Evidências sugerem que o gênero *Mycobacterium* tenha se originado há mais de 150 milhões de anos (DANIEL, 2006). Esse gênero tende a ter uma maior preservação do conteúdo intracelular frente a outras bactérias devido à resistência de sua parede celular - que é rica em lipídios - e por conter DNA com elevado conteúdo GC (% de guaninas e citosinas), o que aumenta a sua estabilidade. Há indícios de que um progenitor primitivo de *M. tuberculosis* tenha sido contemporâneo e sofrido co-evolução com os hominídeos primitivos da África Oriental, há cerca de 3 milhões de anos. Os atuais membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* parecem ter sido originados a partir de um progenitor comum há cerca de 15,000 – 35,000 anos (GUTIERREZ *et al.*, 2005). *Mycobacterium tuberculosis* é a espécie-tipo do gênero *Mycobacterium*, família *Mycobacteriaceae*, sub-ordem *Corynebacteriaceae*, ordem *Actinomycetales*. O complexo *M. tuberculosis* inclui as espécies: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis-BCG*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium Canetti* (EISENACH *et al.*, 1990). É um bacilo reto ou ligeiramente curvo, imóvel, não esporulado, não encapsulado que mede de 1 a 10 µm de comprimento e 0,2 a 0,6 de largura (BRENNAN, 1995).

Os sintomas causados pela TB são aparentemente simples e, muitas vezes, são ignorados durante alguns anos (ou meses). Contudo, na maioria das pessoas infectadas, os sinais e sintomas mais frequentemente descritos são tosse seca contínua durante o início dos sintomas, depois com presença de secreção por mais de quatro semanas, transformando-se, na maioria das vezes, em tosse com pus ou sangue; cansaço excessivo; febre baixa geralmente à tarde; sudorese noturna; falta de apetite; palidez; emagrecimento acentuado; rouquidão; fraqueza e prostração. Os casos graves apresentam dificuldade na respiração; eliminação de grande quantidade de sangue, colapso do pulmão e acúmulo de pus na pleura – e havendo comprometimento dessa membrana, pode ocorrer dor torácica (BRASIL, 2014). A TB é, normalmente, adquirida pela inalação do bacilo (expelido através da fala, espirros e/ou tosse). Desta forma, na grande maioria dos casos, a doença tem início com uma lesão pulmonar (TB pulmonar), podendo ocorrer disseminação para outros órgãos através da corrente sangüínea,

ocasionando o que é chamado de TB extrapulmonar. A pobreza, desnutrição, más condições sanitárias e alta densidade populacional são fatores que contribuem como agravante para a disseminação da doença (BRASIL, 2014).

A BCG (Bacilo Calmetti-Guérin) é a única vacina disponível para a prevenção da TB em humanos. Esta vacina age contra as formas mais graves da TB (miliar e meníngea), mas sua eficácia referente à TB pulmonar continua sendo debatida (PALOMINO *et al.*, 2007). Geralmente, a vacina BCG não previne a infecção por *M. tuberculosis*, nem o desenvolvimento da doença após a infecção (TRNKA *et al.*, 1998). No Brasil, a BCG é fornecida gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2014).

A partir da introdução de agentes antimicobacterianos foi possível estabelecer um tratamento baseado em um conjunto de antibióticos eficaz contra o patógeno causador da TB. Este tratamento é fundamental para o controle da doença, promoção da cura dos pacientes e para a interrupção do ciclo de transmissão – quando corretamente administrado. Os fármacos para o tratamento da TB passaram a ser utilizados em 1944, quando a estreptomicina e o ácido p-aminosalicílico foram descobertos. Atualmente, os fármacos empregados, normalmente, são classificados em fármacos de primeira e segunda linha. Tradicionalmente, existem cinco tipos de fármacos de primeira linha: isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomicina. Os fármacos de segunda linha incluem os aminoglicosídeos canamicina e amicacina, o polipeptídeo capreomicina, ácido p-aminosalicílico, cicloserina, as tioamidas etionamida e protionamida e várias fluoroquinolonas, como a moxifloxacina, levofloxacina e gatifloxacina. Quando ocorre ou suspeita-se de resistência a qualquer um dos fármacos de primeira linha ou quando ocorrem efeitos adversos, são incluídos no tratamento os fármacos de segunda linha. É de grande importância a aderência do paciente ao tratamento, respeitando a ordem preconizada dos antimicobacterianos, para a eliminação completa dos bacilos e também para prevenção do surgimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados. Por esta razão, o tratamento da TB deve ser supervisionado. As cepas resistentes são definidas quando apresentam resistência, pelo menos, aos dois principais

fármacos de primeira linha - isoniazida e rifampicina. Essas cepas necessitam de medidas de controle adicionais, como o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, fármacos mais adequados para o tratamento e uma vacina mais efetiva (PALOMINO *et al.*, 2007).

O tratamento da TB tem duração de, no mínimo, seis meses (BRASIL, 2014). Por isso, há uma grave preocupação no que se refere à aderência ao tratamento durante o tempo adequado à cura definitiva, tendo em vista que a interrupção do tratamento antes do tempo previsto – apesar de a doença atingir remissão – pode ocasionar recidivas, assim como o possível desenvolvimento de cepas resistentes (PALOMINO *et al.*, 2007). Segundo a OMS, cada paciente pulmonar bacilífero, se não tratado, pode infectar em média de 10 a 15 pessoas por ano, mas uma vez tratado, o paciente normalmente para de transmitir a doença em, no máximo, 15 dias (WHO, 2014 a). Desta forma, um diagnóstico rápido e confiável se faz necessário para o início do tratamento, sendo de essencial importância para reduzir a incidência da doença, bem como para a diminuição de gastos em tratamento por parte do governo. No Brasil, toda a população tem direito ao diagnóstico e tratamento da TB gratuitos pelo SUS (BRASIL, 2014).

1.2 O diagnóstico convencional e o diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar

A TB pulmonar ativa pode ser diagnosticada através da detecção do bacilo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras do trato respiratório (PALOMINO *et al.*, 2007). Após o exame físico, o exame radiológico do tórax é usualmente o método de diagnóstico utilizado, pois a TB pulmonar quase sempre causa anormalidades observadas neste exame (KRITSKI *et al.*, 2000). Mesmo com o surgimento de novos métodos moleculares de diagnóstico, o raio X, a baciloscopia e a cultura continuam a ser os métodos convencionais para o diagnóstico da doença. A baciloscopia e a cultura são consideradas o "padrão ouro" para o diagnóstico da TB, especialmente em países menos desenvolvidos, onde, normalmente, são esses os únicos métodos disponíveis para a confirmação da doença (PALOMINO *et al.*, 2007). A baciloscopia é um método rápido e de baixo custo, muito utilizado para diagnosticar amostras multibacilares de *M. tuberculosis*. Já a cultura, é um método utilizado para diagnosticar casos paucibacilares e também é requisitada em casos de suspeita de TB resistente - para testes de suscetibilidade aos fármacos - ou em casos em que há suspeita de que a doença pode ser causada por outro membro do gênero *Mycobacterium*. A baciloscopia e a cultura também podem ser utilizadas para monitoramento da efetividade do tratamento contra a TB e podem ajudar a determinar quando um paciente possui menos probabilidade de estar transmitindo a doença (PALOMINO *et al.*, 2007). Ambos os testes apresentam limitações, enquanto a baciloscopia é uma técnica que possui baixa sensibilidade (aproximadamente 50%), a cultura mostra-se muito mais sensível, porém muito mais demorada (de 3 a 8 semanas) (BROOKS *et al.*, 1995; HONORÉ-BOUAKLINE *et al.*, 2003; KENT & KUBICA, 1985; SHINU *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas, métodos de diagnóstico para detecção do complexo *M. tuberculosis* evoluíram, e as técnicas de amplificação de ácidos nucléicos agora permitem a detecção rápida e sensível do DNA de *M. tuberculosis* diretamente de amostras clínicas, sem a necessidade de realizar uma pré-cultura (BALASINGHAM *et al.* 2009, LARAQUE *et al.*, 2009, MARÍN *et al.*, 2004). Vários sistemas comerciais tornaram-se populares, como o teste Cobas Amplicor MTB

(Roche, Basel, Suíça), o Amplified *M. tuberculosis direct test* (Gen-Probe, San Diego, CA), o sistema BDProbe Tec ET (Becton, Dickinson and Company, Faíscas, MD), e, hoje em dia, o sistema GenXpert MTB RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA) (PIERSIMONI & SCARPARO, 2003). Nosso grupo desenvolveu o Detect-TB (Labtest, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), um teste comercial molecular para o diagnóstico de TB, com base na detecção colorimétrica de produto amplificado hibridizado com sonda específica fixada em microplacas (MICHELON *et al.*, 2011). Entre os métodos de amplificação que vêm sendo comercializados, quatro métodos ganharam difusão mundial e foram validados através de estudos. São eles:

Amplified MTD®: desenvolvido pela GenProbe (San Diego, CA, USA). Aprovado pela Food and Drug Administration of the United States (US FDA) para baciloscopia negativa ou positiva de amostras respiratórias (escarro). Baseado no sistema de amplificação mediado por transcrição reversa, utiliza o RNA ribossomal (rRNA) como alvo da detecção (PALOMINO *et al.*, 2007).

Amplicor MTB Test®: desenvolvido pela Roche Molecular Systems (Basel, Suíça), baseia-se na técnica de PCR. Aprovado pela FDA para baciloscopia positiva em amostras respiratórias. O DNA da micobactéria é amplificado com *primers* específicos da região do gene que codifica o rRNA 16S (PALOMINO *et al.*, 2007).

BD ProbeTec ET®: desenvolvido pela Becton Dickinson (Sparks, MD), o BD ProbeTec ET ainda não foi aprovado pela FDA. Utiliza a DNA polimerase e a amplificação isotermal de deslocamento de fita para produzir várias cópias do elemento de inserção *IS6110*, exclusivo ao complexo *Mycobacterium* (PALOMINO *et al.*, 2007).

Xpert® MTB/RIF: desenvolvido pela Cepheid, Inc. (Sunnyvale, CA), o Xpert MTB/RIF foi aprovado pela FDA. Através de um sistema automatizado, utiliza a tecnologia de PCR em tempo real para fazer a detecção do complexo *M. tuberculosis* e identificar resistência à rifampicina em, aproximadamente, duas horas (Cepheid, Catalog No. GXMTB/RIF-10).

A capacidade destes ensaios para realizar a detecção do complexo *M. tuberculosis* em amostras clínicas é diretamente relacionada à sequência-alvo escolhida, à eficiência do processo de extração e purificação do DNA e também da escolha da metodologia de amplificação (ALDOUS *et al.*, 2005). Ao longo dos anos, novas plataformas de reação em cadeia da polimerase (PCR), como a PCR em tempo real, têm sido extensivamente desenvolvidas visando a melhoria das tecnologias de PCR (Cheng *et al.* 2005). A tecnologia da PCR tem sido aperfeiçoada e protocolos baseados em PCR em tempo real têm demonstrado numerosas vantagens sobre os ensaios convencionais de amplificação de ácidos nucléicos. Algumas das principais vantagens da PCR em tempo real em comparação à PCR convencional são o tempo reduzido e a automação do processo, o que reduz a mão-de-obra e, conseqüentemente, o risco de contaminação cruzada (ESPY *et al.*, 2006). A PCR em tempo real, que utiliza dois *primers* e uma sonda de detecção específica, é um método molecular que oferece muitas vantagens, e pode ser utilizado para detecção e identificação de vírus, bactérias e micobactérias (DROUILLON *et al.*, 2007). Para detecção dos produtos amplificados por uma PCR convencional, é necessário esperar o término da reação. Entretanto, a PCR foi aprimorada para uma detecção no momento em que a reação está ocorrendo, sendo que a amplificação e a detecção ocorrem no mesmo tubo (PARASHAR *et al.*, 2006). A aplicação da PCR em tempo real na rotina laboratorial oferece vantagens como a fácil utilização e um bom rendimento, já que não requer manipulação após a reação de PCR e evita a contaminação cruzada por amplicons (ZHANG *et al.*, 2003). Esta técnica, quando utiliza sondas fluorescentes, também tem demonstrado ser útil para detecção de micobactérias (SHRESTHA *et al.*, 2003) e permite o monitoramento da amplificação e a detecção de mutações (KOCAGOZ *et al.*, 2005).

O genoma de *M. tuberculosis* possui muitos elementos polimórficos de DNA repetitivo que podem ser utilizados para a discriminação entre os isolados. Elementos de DNA repetitivo que têm sido utilizados em diversos tipos de estudos moleculares incluem as sequências de inserção (IS), como o IS6110, os DR - *direct repeat elements*, os PGRS - *the major polymorphic tandem repeat sequences*, os MPTR - *the polymorphic GC-rich tandem repeat sequences*, e as

sequências ETR - *exact tandem repeat*. Trabalhos anteriores têm demonstrado que combinações de métodos moleculares utilizando diferentes elementos podem aperfeiçoar a discriminação entre os isolados de *M. tuberculosis* (EVANS *et al.*, 2008). O elemento de inserção IS6110 é uma das sequências-alvo comumente escolhidas, característica do complexo *M. tuberculosis*, visto que a sua presença pode alcançar até 20 cópias no genoma (EISENACH *et al.*, 1990). Uma outra alternativa de sequência-alvo de DNA é a região espaçadora intergênica (*internal transcribed spacer* - ITS) 16S-23S, codificadora de RNA ribossomal (rRNA), que também trata-se de um bom alvo, já que é um constituinte essencial do ribossomo bacteriano (MOKADDAS & AHMAD, 2007; ROTH *et al.*, 1998). Esta sequência de DNA está presente em uma cópia no cromossomo e tem sido utilizada em estudos anteriores sobre TB (STOUT *et al.*, 2008).

Variações de sensibilidade, especificidade e os altos custos dos testes moleculares atualmente disponíveis no mercado têm dificultado a incorporação destes sistemas para serem utilizados largamente no diagnóstico da TB (FLORES *et al.*, 2005). Como o diagnóstico da TB apresenta limitações, torna-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias com maior rapidez e melhor acurácia na identificação do agente infeccioso causador da doença (FILHO & REMUALDO, 2007), pois quanto mais rápido for feito o diagnóstico, mais precocemente pode ser iniciado o seu tratamento (LING *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando-se o avanço das tecnologias de diagnóstico e as limitações do diagnóstico da TB, evidencia-se com clareza que o desenvolvimento de um método diagnóstico rápido e confiável é de suma importância para o controle da doença. O diagnóstico molecular, baseado na amplificação de ácidos nucleicos, vem apresentando resultados bastante satisfatórios, de alta sensibilidade e alta especificidade em tempo reduzido. Devido ao custo elevado dos métodos de diagnóstico molecular comerciais, muitas vezes torna-se impeditiva a sua implantação na rotina dos laboratórios, especialmente naqueles pertencentes à rede de saúde pública. Assim, o desenvolvimento de métodos moleculares com custos mais acessíveis que os métodos comerciais disponíveis, parece ser fundamental para incorporar a rotina de investigação molecular em laboratórios clínicos e de pesquisa.

Dado que a capacidade dos ensaios para detecção do complexo *M. tuberculosis* em amostras clínicas é extremamente dependente da sequência-alvo escolhida, da eficiência do processo de extração do DNA e também das próprias metodologias empregadas para a detecção do DNA, e visto a alta variabilidade de sensibilidade e especificidade encontradas em estudos anteriores, este trabalho visa realizar um estudo comparativo entre duas metodologias de detecção de DNA de *M. tuberculosis*, sendo uma comercial e outra *in house*, com o objetivo de buscar definir a real importância destas metodologias para colaborar com o diagnóstico da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi determinar a acurácia do Detect-TB e do ensaio TaqMan-IS6110 em comparação com os métodos diagnósticos padrão ouro para a TB e o desfecho clínico.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar duas metodologias moleculares para o diagnóstico de TB, o Detect-TB e o ensaio TaqMan-IS6110 para detecção do DNA de *M. tuberculosis*, sendo uma metodologia comercial e outra *in house*;
- Padronizar um protocolo do ensaio TaqMan-IS6110 utilizando o sistema TaqMan (Applied Biosystems, Life Technologies) para detecção de *M. tuberculosis*, utilizando como alvo o elemento de inserção IS6110;
- Comparar os resultados do Detect-TB com o padrão ouro para o diagnóstico e com o desfecho clínico, calcular sensibilidade (SE), especificidade (SP), valor preditivo negativo (VPN) e valor preditivo positivo (VPP), considerando cada parâmetro;
- Comparar os resultados do ensaio TaqMan-IS6110 com o padrão ouro para o diagnóstico e com o desfecho clínico, calcular SE, SP, VPN e VPP, considerando cada parâmetro.

4. MANUSCRITO

“Comparison of two molecular methodologies for the diagnosis of tuberculosis”.

Molecular tuberculosis diagnosis

Comparison of two molecular methodologies for the diagnosis of
tuberculosis

Karen Barros Schmid¹, Regina Bones Barcellos¹, Tatiana Schäffer Gregianini²,
Mirela Verza¹, Daniela Maria de Paula Ramalho³, Martha Maria Oliveira³, Maria
Lucia Rosa Rossetti^{1,4}.

¹ Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Fundação
Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre, Brazil.

² Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul. IPB-LACEN/RS, Porto
Alegre, Brazil.

³ Centro de Pesquisa em Tuberculose, Universidade Federal do Rio de Janeiro
(UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil.

⁴ Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Brazil.

***Corresponding author:** Maria Lucia Rosa Rossetti, Centro de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico (CDCT) - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa
em Saúde (FEPPS); Av. Ipiranga 5400, 3º andar, CEP 90.610-000 - Porto Alegre,
Rio Grande do Sul, Brazil. Phone/Fax: +55 (51) 32884000 / 33520336. E-mail:
mrossett@terra.com.br.

Abstract

Considering the limitations of conventional tuberculosis (TB) diagnosis and the advancement of diagnostic technologies, our group developed an in house IS6110-TaqMan assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA. The aim of the study was to determine the accuracy of the commercial molecular diagnostic assay Detect-TB and the IS6110-TaqMan assay compared to the TB gold standard diagnostic methods and the clinical outcome. A total of 216 clinical specimens of spontaneous sputum from TB suspected patients were included. Detect-TB sensitivity (SE) and specificity (SP) compared with the smear microscopy and/or culture (n=109) were 89.4% and 70.4%. Detect-TB SE and SP compared with the clinical outcome (n=197) were 86.6% and 66.4%. IS6110-TaqMan assay SE and SP compared with the smear microscopy and/or culture (n=109) were 92.1% and 62.0%. IS6110-TaqMan assay SE and SP compared with the clinical outcome (n=197) were 93.3% and 55.5%. The concordance among the tests were demonstrated by the Kappa index of 0.56 ($P < 0.001$) (n=197). IS6110-TaqMan assay and Detect-TB showed consistent SE and lower SP when compared with other current molecular in house and commercial kits. IS6110-TaqMan assay should be evaluated with a larger number of samples to be validated and may eventually be implemented commercially.

Key-words: tuberculosis; molecular diagnosis; Detect-TB; IS6110; TaqMan real time PCR.

Funding sources: Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS).

Introduction

Despite global efforts to control tuberculosis (TB), the disease still represents a considerable challenge to public health. TB is second only to HIV/AIDS as the greatest killer worldwide due to a single infectious agent (WHO 2014). In 2012, the TB prevalence in Brazil was 59 for every 100,000 inhabitants (WHO 2014). The routine methods for establishing a diagnosis of TB are smear microscopy and culture for *Mycobacterium tuberculosis* (Shinu et al. 2011). Both tests have limitations, as conventional culture may require 3–4 weeks or longer, while smear microscopy shows low sensitivity (SE) (Shinu et al. 2011, Honoré-Bouakline et al. 2003). In the past several decades, diagnostic methods for *M. tuberculosis* complex detection have improved, and nucleic acid amplification techniques now allow rapid and sensitive detection directly from clinical samples, without the need of pre-culture (Balasingham et al. 2009, Laraque et al. 2009, Marín et al. 2004). Several commercial systems became popular, as the Cobas Amplicor MTB test (Roche, Basel, Switzerland), the amplified *M. tuberculosis* direct test (Gen-Probe, San Diego, CA), the BDProbe Tec ET system (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD), and, nowadays, the GenXpert MTB/RIF system (Cepheid, Sunnyvale, CA) (Piersimoni & Scarparo 2003). Our group developed the Detect-TB (Labtest, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), a commercial molecular diagnostic assay for TB, based on colorimetric detection of

amplified product hybridized with specific probe fixed on microplate (Michelon et al. 2011). Over the years, real-time polymerase chain reaction (PCR) assays platforms have been extensively developed seeking the improvement of PCR technologies (Cheng et al. 2005). Some of the main advantages of real-time PCR compared to PCR are the shortened turnaround time; automation of the procedure, which reduces hands-on time, and a decrease in the risk of cross-contamination (Espy et al. 2006).

In this study, our group developed an in house IS6110-based real time PCR using TaqMan probes for the detection of *M. tuberculosis* complex DNA. Considering the advancement of diagnostic technologies, the aim of the present study was to determine the accuracy of the Detect-TB and the IS6110-TaqMan assay compared to the TB gold standard diagnostic methods and the clinical outcome.

Materials and Methods

Clinical specimens:

A total of 216 clinical specimens of spontaneous sputum from patients suspected of having TB were included in this study. All sputum samples were provided by a specimen collection of the Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) of the Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, the southern region of Brazil.

Routine Laboratory Process:

Microbiological testing:

The specimens were tested by the Ziehl-Neelsen method (ZN) using smear microscopy, cultured in Löwenstein Jensen and identified according to previous description (MS/SVS 2008).

Molecular testing:

Detect-TB procedures:

Laboratory technicians who conducted the molecular testing were blinded to the bacteriology results. DNA extraction and purification were performed as described by Michelon et al (2011). DNA samples were divided into two equal portions, one for the Detect-TB and the other one for the IS6110-TaqMan assay. To prevent DNA contamination, strict room separation was used, including a work flow from initiation of the PCR to hybridization.

The Detect-TB (Labtest, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) was performed according manufacturer's instructions. Briefly, *M. tuberculosis* complex DNA was amplified using biotinylated primers targeting the IS6110 fragment. These amplified products were reverse-hybridized on microwell plates (Nunc Immobilizer™ Amino Surface, Nunc A/S, Roskilde, Denmark) to a fixed aminated probe complementary to the internal region of the amplified IS6110 fragment. The hybridization signal was detected by colorimetry using the streptavidin-peroxidase/TMB system and measured using a spectrophotometer with a 450/620

nm filter. The absorbance of the negative control was subtracted from the results, as recommended by Detect-TB. All samples with readings above 0.275 nm were considered positive for *M. tuberculosis* complex DNA (Michelon et al. 2011).

Real Time PCR procedures:

For the IS6110-TaqMan assay, DNA extraction and purification were performed as described previously (Michelon et al. 2011). Real-time PCR was conducted according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems by Life Technologies). The IS6110-TaqMan assay was performed on an ABI 7500 TaqMan system (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom) to amplify and detect the IS6110 multicopy elements, as previously described (Tanaka et al. 2004). Each sample was tested in duplicate and coamplified with an exogenous internal positive control (Applied Biosystems by Life Technologies) for detecting endogenous PCR inhibitors. Each reaction included 1.25 μ L of primers (Forward: 18 μ M; Reverse: 18 μ M) and probe (Reporter: 5 μ M), 12.5 μ L from a 1X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems by Life Technologies), 5 μ L of template DNA, 3.75 μ L from the 10X Exo IPC Mix (primers and TaqMan probe labeled with VIC), 0.5 μ L of 50X Exo IPC DNA and pure water added up to a final volume of 25 μ L. The oligonucleotide sequences were as follows: forward primer: 5'-CAGGACCACGATCGCTGAT-3'; reverse primer: 5'-GCTTCGGACCACCAGCA-3'; and the fluorescent probe: 5'-TCCCGCCGATCTCG-3' (labeled with a fluorescent reporter dye FAM at the 5' end and with a non-fluorescent quencher dye MGB at the 3' end). The expected

amplification product size was a 73 bp sequence in the IS6110 insertion sequence. Cycling conditions were 1 cycle at 50°C for 2 min., initial denaturation at 95°C for 10 min., followed by 55 cycles of denaturation at 95°C for 15 seg., and annealing and amplification at 60°C for 1 min.. Milli-Q water negative controls and *Mycobacterium bovis* BCG positive controls were included in all amplification reactions. The positive controls were the same as used in Detect-TB.

IS6110-TaqMan assay standardization:

The IS6110-TaqMan assay is a Custom TaqMan Gene Expression Assay and was constructed according to the manufacturer's instructions. The optimization of this assay was performed by evaluating the use of different concentrations of the primer set, probe and exogenous internal positive control. The analytical SE of the IS6110-TaqMan assay was determined by performing the procedure described above using PCR products obtained from a serial dilution starting from 10 ng/μL and up to 1.2 fg/μL of the *M. tuberculosis* H37Rv DNA (10 ng/μL, 5 ng/μL, 2.5 ng/μL, 1.25 ng/μL).

The specificity (SP) of the assay was determined by performing the described IS6110-TaqMan assay using 100 ng of DNA extracted from *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus pneumoniae*, *Salmonella enterica* and *Haemophilus influenzae* obtained from the Laboratório Central do Rio Grande do Sul and *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium*

fortuitum-peregrinum and *Mycobacterium phlei* obtained from the Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Brazil.

TB case definition:

Pulmonary TB cases were defined as those with a positive smear microscopy and/or positive culture for *M. tuberculosis* in the respiratory specimen or those with suggestive clinical outcome, including characteristic symptoms. Clinical outcome was defined as symptomatic patient who received treatment and showed improvement of disease symptoms after 6 months. Negative pulmonary TB patients were considered whose smear microscopy and culture for *M. tuberculosis* were negative or who did not show characteristic symptoms. The gold standard criteria for all pulmonary TB final diagnosis included positive smear microscopy and/or culture and/or clinical outcome.

Participant enrollment:

All patients with the information of confirmed previous or current TB treatment were excluded from data analysis.

Data analysis:

All data were entered into a computer database and analyzed with the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v21.0 software (Chicago, IL, USA).

Performance and accuracy analysis:

The endpoints were SE, SP, and the negative and positive predictive values (NPV, PPV) for detection in suspected pulmonary TB patients. For *M. tuberculosis* DNA detection, analysis were performed in the following order: a) the Detect-TB SE, SP, NPV and PPV were evaluated with the smear microscopy and/or culture; b) the Detect-TB SE, SP, NPV and PPV were evaluated with the clinical outcome; c) the Detect-TB SE, SP, NPV and PPV were evaluated with the IS6110-TaqMan assay; d) the IS6110-TaqMan assay SE, SP, NPV and PPV were evaluated with the smear microscopy and/or culture and e) the IS6110-TaqMan assay SE, SP, NPV and PPV were evaluated with the clinical outcome. All the analysis were performed using the gold standard criteria for all pulmonary TB final diagnosis. The gold standard was defined as smear microscopy and/or culture and/or clinical outcome.

Statistical analysis:

The agreement between the tests was evaluated using kappa value. P-values lower than 0.05 were considered statistically significant. Smear microscopy and/or culture and/or clinical outcome were primarily considered the gold standard for performance calculation. Analysis were performed in the following order: a) the Detect-TB was evaluated with the smear microscopy and/or culture; b) the Detect-TB was evaluated with the clinical outcome; c) the Detect-TB was evaluated with the IS6110-TaqMan assay; d) the IS6110-TaqMan assay was evaluated with the smear microscopy and/or culture; and e) the IS6110-TaqMan assay was evaluated

with the clinical outcome. The SE and SP values were also calculated to evaluate each system. The cumulative accuracy was estimated by means of a receiver operating characteristic (ROC) curve, a regression line that summarizes the overall diagnostic accuracy and the trade-off between sensitivity and specificity of the Detect-TB and IS6110-TaqMan assay when compared with the smear microscopy and/or culture and with the clinical outcome. The area under the curve (AUC) was used as measure of the overall accuracy of the test (an AUC value of 100% indicates a perfect test while an AUC value of 50% means that the test does not have discriminating ability).

Ethics:

This study was approved by the Ethical Committee of Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde of Rio Grande do Sul (FEPPS-RS) (protocol number 002936-20.69/10-5).

Results

IS6110-TaqMan assay optimization:

All reaction conditions were followed as recommended by the manufacturer (Labtest, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). The best conditions of primers concentrations and probe for the PCR reactions were 900 nmol and 250 nmol, respectively, and for the exogenous internal positive control 1350 nmol and 375 nmol (primers and probe). The detection limit of IS6110-TaqMan assay was 4.8

fg/ μ L of the template DNA. Standard curve was generated using a serial dilution of the template DNA and the reproducibility of the replicates (R2) was 0.998. It was defined that the threshold cycle value (C_T) at above 45 cycles was accepted as a negative or inconclusive finding due to the greater variability and unreliable detection. The C_T value for 4.8 fg/ μ L of the template DNA was at 36.33 ± 0.78 cycles.

For the SP of the assay, no amplification was detected for the microorganisms tested.

Laboratory and clinical findings:

Of the 216 analyzed samples, all of them had clinical outcome results and 128 of these had also smear microscopy and/or culture results. Nineteen samples were excluded from data analysis, by virtue of confirmation of previous or current TB treatment. Thus, the analysis was performed in two manners. First, considering the gold standard to be smear and/or culture (microbiological criteria), and second, considering the gold standard as the clinical outcome. All results are disposed in Table 1.

Considering smear and/or culture as the gold standard:

Of the 109 analyzed samples, 38 (34.9%) had positive results using smear microscopy and/or culture testing methods (6 only culture and 32 smear microscopy and culture), while 71 (65.1%) had negative results. Of the 38 positive smear microscopy and/or culture samples, 34 (31.2%) were positive for the

Detect-TB and 4 (3.7%) were false-negative (FN). Of the 71 negative smear microscopy and/or culture samples, 50 (45.9%) were negative for the Detect-TB and 21 (19.3%) were false-positive (FP). Of the 38 smear microscopy and/or culture positive samples, 35 (32.1%) were positive for the IS6110-TaqMan assay and 3 (2.7%) were FN. Of the 71 smear microscopy and/or culture negative samples, 44 (40.4%) were negative for the IS6110-TaqMan assay and 27 (24.8%) were FP. No sample was in the gray zone.

Considering the gold standard as the clinical outcome:

Of the 197 samples, 60 (30.4%) had clinical outcome positive results, while 137 (69.5%) had negative results. Of the 60 clinical outcome positive results, 52 (26.4%) were positive for the Detect-TB and 8 (4.0%) were FN. Of the 137 clinical outcome negative results, 91 (46.2%) were negative for the Detect-TB and 46 (23.3%) were FP. Of the 60 clinical outcome positive results, 56 (28.4%) were positive for the IS6110-TaqMan assay and 4 (2.0%) were FN. Of the 137 clinical outcome negative results, 76 (38.6%) were negative for the IS6110-TaqMan assay and 61 (31.0%) were FP. No sample was in the gray zone.

Table 1. Results for Detect-TB and IS6110-TaqMan assay considering smear microscopy and/or culture and the clinical outcome as the gold standard.

	Detect-TB				IS6110-TaqMan assay			
	n	Detect-TB	False-negative	False-positive	n	IS6110-TaqMan assay	False-negative	False-positive
Microbiological Criteria								
<u>Positive</u>	38	34	-	-	38	35	-	-
Smear	0	-	0	-	0	-	0	-
Culture	6	4	2	-	6	5	1	-
Smear + Culture	32	30	2	-	32	32	2	-
<u>Negative</u>	71	50	-	21	71	44	-	27
Total	109	84	4	21	109	79	3	27
Sensitivity (%)			89.4				92.1	
Specificity (%)			70.4				62.0	
Kappa			(p < 0.001)				(p < 0.001)	
<hr/>								
	n	Detect-TB	False-negative	False-positive	n	IS6110-TaqMan assay	False-negative	False-positive
Clinical Outcome								
<u>Positive</u>	60	52	8	-	60	56	4	-
<u>Negative</u>	137	91	-	46	137	76	-	61
Total	197	143	8	46	197	132	4	61
Sensitivity (%)			86.6				93.3	
Specificity (%)			66.4				55.5	
Kappa			(p < 0.001)				(p < 0.001)	

Performance of the Detect-TB compared with the smear microscopy and/or culture:

The SE and SP were 89.4% (confidence interval [CI] = 83.1 – 95.6) and 70.4% (CI= 61.4 – 79.4), respectively. The PPV and NPV were 61.8% (CI= 52.2 – 71.4) and 92.6% (CI= 87.2 – 98.0), respectively. The Detect-TB and smear microscopy and/or culture showed moderate agreement, as demonstrated by the Kappa index of 0.54 ($P < 0.001$).

The Figure 1 illustrates the ROC curve for the Detect-TB and the IS6110-TaqMan assay compared with the smear microscopy and/or culture. The area under the curve for the Detect-TB was 0.799 and the P value was < 0.001 . The area under the curve for the IS6110-TaqMan assay was 0.770 and the P value was < 0.001 .

Performance of Detect-TB compared with the clinical outcome:

The SE and SP were 86.6% (CI= 81.6 – 91.6) and 66.4% (CI= 59.5 – 73.2), respectively. The PPV and NPV were 53.0% (CI= 45.8 – 60.2) and 91.9% (CI= 87.8 – 96.0), respectively. The Detect-TB and clinical outcome also showed moderate agreement, as demonstrated by the Kappa index of 0.45 ($P < 0.001$).

The Figure 2 illustrates the ROC curve for the Detect-TB and the IS6110-TaqMan assay compared with the clinical outcome. The area under the curve for the Detect-TB was 0.810 and the P value was < 0.001 . The area under the curve for the IS6110-TaqMan assay was 0.776 and the P value was < 0.001 .

Performance of the IS6110-TaqMan assay compared with the smear microscopy and/or culture:

The SE and SP were 92.1% (CI= 86.6 – 97.6) and 62.0% (CI= 52.4 – 71.6), respectively. The PPV and NPV were 56.4% (CI= 46.6 – 66.2) and 93.6% (CI= 88.5 – 98.6), respectively. The IS6110-TaqMan assay and the smear microscopy and/or culture also showed moderate agreement, as demonstrated by the Kappa index of 0.47 ($P < 0.001$).

Performance of the IS6110-TaqMan assay compared with the clinical outcome:

The SE and SP were 93.3% (CI= 89.5 – 97.0) and 55.5% (CI= 48.3 – 62.7), respectively. The PPV and NPV were 47.9% (CI= 40.7 – 55.1) and 90.5% (CI= 86.1 – 94.8), respectively. The IS6110-TaqMan assay and the clinical outcome showed mild agreement, as demonstrated by the Kappa index of 0.38 ($P < 0.001$).

Concordance among Detect-TB and the IS6110-TaqMan assay:

The concordance among the testes were demonstrated by the Kappa index of 0.56 ($P < 0.001$), considering $n = 197$.

Discussion

Nowadays, the diagnosis and treatment of active TB are the most important strategies of TB control programs. Globally, there is a high number of patients with

undetected active TB. In a population where TB is a high prevalence disease, the search for faster and more accurate diagnosis methodologies is crucial. The study main objective was to compare two molecular methodologies with potential to be used in the routine clinical practice, the Detect-TB (Labtest, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) and the IS6110-TaqMan assay.

In this study, the analysis was performed within two manners. First, considering as the gold standard smear microscopy and/or culture, and second, considering the clinical outcome as the gold standard. When considering smear and/or culture as the gold standard (n=109), 34 of the 38 positive smear microscopy and/or culture samples were positive for the Detect-TB and 4 were FN. Of the 71 negative smear microscopy and/or culture samples, 50 were negative for the Detect-TB and 21 were FP. The Detect-TB detected the DNA of *M. tuberculosis* in 21 samples from patients whose conventional tests (smear microscopy and culture) were negative. Of these, 15 samples were also positive for IS6110-TaqMan assay and 2 samples had also positive clinical outcome. Considering only the smear microscopy, the Detect-TB identified 4 culture positive samples that smear microscopy did not. Of these 4 FN smear microscopy samples, 2 were negative for the clinical outcome. For the IS6110-TaqMan assay, 35 samples were positive (of the 38 positive smear microscopy and/or culture), 44 negative (of the 71 negative smear microscopy and/or culture), 3 were FN, and 27 FP. The IS6110-TaqMan assay detected the DNA of *M. tuberculosis* in 27 samples from patients whose conventional tests (smear microscopy and culture) were negative. Of these, 2 samples had positive clinical outcome. Considering only the smear microscopy, the IS6110-TaqMan assay identified 4 culture positive

samples that smear microscopy did not. Of these 4 samples, 3 were negative for the clinical outcome. Of the 6 smear microscopy negative samples, but culture positive, the Detect-TB identified 4 of these, while the IS6110-TaqMan assay identified 5. This suggests that the Detect-TB and the IS6110-TaqMan assay are able to identify positive samples with negative smear microscopy and clinical outcome. It was not possible to access the information of previous treatment of all patients samples. Thus, it is possible to infer that probably other samples could have been collected from patients previously treated or under treatment for TB. Molecular tests can detect pathogen DNA even after the disease has been eradicated, leading to FP results (Assunção et al. 2014). Therefore, molecular tests should not be used for patients with previous TB treatment or under treatment. The Detect-TB aims only the molecular disease diagnosis and not monitoring TB treatment, as described according to the manufacturer's instructions. For this reason, all samples with information of previous or current treatment (n=19) were excluded from the data analysis of both tests.

When considering the clinical outcome as the gold standard (n=197), of the 60 clinical outcome positive results, 52 were positive for the Detect-TB and 8 were FN. Of the 137 clinical outcome negative results, 91 were negative for the Detect-TB and 46 were FP. For the IS6110-TaqMan assay, 56 were positive, 4 FN, 76 negative and 61 FP. Similarly to the results when considering the smear microscopy and/or culture as the gold standard, a large number of FP samples was observed. Evidently, this was not expected, but considering that molecular tests can be more sensitive than the routine microbiological tests for TB diagnosis, this could reveal an increase of TB cases detection. For the IS6110-TaqMan

assay, of the 27 FP samples for smear microscopy and/or culture, 25 FP samples had C_T values above 35, which may indicate the presence of small amounts of DNA from *M. tuberculosis* in these samples. Polymerase chain reaction (PCR) and TaqMan real time PCR have been described as molecular methodologies of SE and SP over the conventional methods, seeking to reduce the time required for the TB diagnosis (Katoch 2004). Although smear microscopy is the most widely used method for diagnosis of pulmonary TB and an inexpensive test, the SE is about 45-80% with culture confirmed pulmonary TB cases. Approximately, only 40-50% of patients with pulmonary TB are smear-positive, since sputum must contain at least 5,000 bacilli/mL to be detectable by smear microscopy (Siddiqi et al. 2003). Currently, culture is the most sensitive available test for TB diagnosis. However, it may require 2-8 weeks for the isolation of *M. tuberculosis* from a clinical specimen and may give FN results in 10-20% of cases (Pai et al. 2004). On the other hand, molecular tests can detect 50 to 80% of cases subsequently confirmed by culture and provide results in hours (CDC 2009).

It is important to emphasize that there is scarce information about the samples involved in this study, as the information of previous TB treatment or treatment in progress from all patients involved in this study - which can be inferred as a limitation of the work. Thus, the high FP rate samples in this study could probably be related to the enrollment of samples from patients with previous treatment or under treatment for TB, since it was not possible to obtain this data from all patients included in this study. Otherwise, part of FP results may be due to the presence of *M. tuberculosis* DNA in the samples, but the absence of viable bacteria for growth in culture. Molecular DNA-based diagnostics tend to

overestimate the number of live cells due to the relatively long persistence of DNA after cell death (Nocker et al. 2006). Despite strict room separation was used, including a work flow from initiation of the PCR to hybridization, some FP results might also be explained by possible contamination of true positive samples or PCR amplicons.

In some specific patient population, as HIV positive, the SE could be much lower, which results in an important number of FN samples. In this study, it was not possible to access this information about HIV status. Inefficient homogenization may also have contributed to the FN samples and the absence of organisms in the small volumes sampled for the test. *IS6110* is present in multiple copies in the bacterial genome, but some strains from certain parts of the world lack it (Lok et al. 2002). This may have caused some FN results, which may have affected a little the SE of the assays. A possible solution to this problem would be to amplify more than one target sequences. For the *IS6110*-TaqMan assay an internal amplification control was used, hence it was possible to discard FN results due to the presence of TaqDNA polymerase inhibitors. The internal control has a different fluorescence from the target probe and failure of amplification could be detected. Smear microscopy negative results may be due to presence of only a few bacteria, while culture negative results could be explained by microbiological growth inhibition.

The SE and SP of the Detect-TB compared with the smear microscopy and/or culture were 89.4% (CI= 83.1 – 95.6) and 70.4% (CI= 61.4 – 79.4), respectively. When the Detect-TB was compared with the clinical outcome, the SE were 86.6% (CI= 81.6 – 91.6) and SP 66.4% (CI= 59.5 – 73.2), respectively. The

SE and SP of the IS6110-TaqMan assay compared with the smear microscopy and/or culture were 92.1% (CI= 86.6 – 97.6) and 62.0% (CI= 52.4 – 71.6), respectively. When the IS6110-TaqMan assay was compared with the clinical outcome were 93.3% (CI= 89.5 – 97.0) and 55.5% (CI= 48.3 – 62.7), respectively. According to Figure 1, when the Detect-TB and the IS6110-TaqMan assay were compared with the smear microscopy and/or culture, the area under the ROC curve for the Detect-TB was 0.799 ($P < 0.001$), a slightly higher value than found for the IS6110-TaqMan assay, which was 0.770 ($P < 0.001$). When compared the Detect-TB and the IS6110-TaqMan assay with the clinical outcome, the area under the ROC curve for the Detect-TB was 0.810 ($P < 0.001$), while the area under the curve for the IS6110-TaqMan assay, was 0.776 ($P < 0.001$). This can be seen in Figure 2. Although in this study SE levels were consistent or slightly higher, SP levels were lower than the previously studies reported of commercial and in house tests (Antonienka et al. 2013, Armand et al. 2011, Lira et al.2012, Miller et al. 2011, Siddiqi et al. 2003, Singh & Kashyap 2012, Weyer et al. 2013, Yang et al. 2011). In a previous work, in which samples of patients with previous history treatment or under treatment were not included, the Detect-TB showed SE and SP of 94% and 100%, respectively, in a group of 175 spontaneous sputum samples (Michelon et al. 2011). Poor SE can result in FN results with adverse consequences for patient morbidity and mortality and ongoing disease transmission. Poor SP can result in FP results exposing patients to unnecessary treatment while the underlying cause of disease remains undiagnosed (Weyer et al. 2013).

The concordance among the Detect-TB and the IS6110-TaqMan assay was demonstrated by the Kappa index of 0.56 ($P < 0.0001$), considering $n=197$, which demonstrates moderate agreement among the tests. Considering the gold standard as smear microscopy and/or culture, the Detect-TB detected 34 positive results from 38 positive smear microscopy and/or culture samples, while the IS6110-TaqMan assay detected 35 positive results. Of the 71 negative smear microscopy and/or culture samples, 50 were negative for the Detect-TB and 44 were negative for the IS6110-TaqMan assay. Considering the gold standard as the clinical outcome, the Detect-TB detected 52 positive results from 60 positive clinical outcome samples, while the IS6110-TaqMan assay detected 56 positive results. Both tests showed some conflicting results with the gold standard, but similar between them. In addition, both tests showed a high number of FP results and this number was even higher for IS6110-TaqMan assay (27 versus 21 of the Detect-TB, considering the smear microscopy and/or culture as the gold standard; and 61 versus 46 of the Detect-TB, considering the clinical outcome as the gold standard). These results can be explained in part by the upper SE of molecular tests (Katoch 2004). Therefore, another fact that must be taken into account is that some real positives samples may not have been identified by smear microscopy and culture. A total of 15 samples showed FP results in both molecular assays. In addition, the IS6110-TaqMan assay showed a great detection limit of 4.8 fg/ μL of the template DNA, while detection limit of Detect-TB is about 50 colony-forming units (CFU), this fact could explain the higher number of IS6110-TaqMan assay FP samples.

With the emergence and reemergence of various infections with significant impact on public health, such as TB, it is necessary the development of new methodologies with faster results and more accuracy for the identification of infectious agents (FILHO & REMUALDO 2007). A fast and reliable diagnosis is needed for the beginning of TB treatment, which is essential to reduce the disease incidence, even as to reduce costs on treatment by the government. Both molecular tests described in this study have the potential to be implemented in the routine, but further tests are needed.

The main drawback of this study was the recruitment of an inadequate sample population and sample size, which produced high percentages of FP results, thus affecting the quality of results. For these reasons, some more analysis with a higher number of samples will be required. Nevertheless, this study demonstrates that Detect-TB and the IS6110-Taqman assay can be auxiliary tools for diagnosing active pulmonary TB when used in conjunction with conventional tests, thus helping to increase the SE and SP of the diagnosis.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to the research groups at CDCT/FEPPS and at Centro de Pesquisa em Tuberculose, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil, for their cooperation.

References

Antonenka U, Hofmann-Thiel S, Turaev L, Esenalieva A, Abdulloeva M, Sahalchyk E, Alnour T, Hoffmann H 2013. Comparison of Xpert MTB/RIF with ProbeTec ET DTB and COBAS TaqMan MTB for direct detection of *M. tuberculosis* complex in respiratory specimens. BMC Infectious Diseases 13:280.

Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemaître N 2011. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. J Clin Microbiol 49, 1772–1776.

Assunção TM, Batista Jr. EL, Deves C, Villela AD, Pagnussatti VE, Dias ACO, Kritski A, Rodrigues-Junior V, Basso LA, Santos DS 2014. Real time PCR quantification of viable *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples treated with propidium monoazide. Tuberculosis 94:421-427.

Balasingham SV, Davidsen T, Szpinda I, Frye SA, Tonjum T 2009. Molecular diagnostics in tuberculosis: basis and implications for therapy. Mol Diagn Ther 13:137–151.

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

Cheng VC, Yew WW, Yuen KY 2005. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24: 711–720.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, Smith TF 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:165–256.

Filho MA, Remualdo V 2007. *Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico de Doenças Infecciosas. Prática Hospitalar* v.53, p. 33-35, set-out.

Honoré-Bouakline S, Vincensini J-P, Giacuzzo V, Lagrange PH, Herrmann J-L 2003. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *J Clin Microbiol* 41:2323–2329.

Katoch VM 2004. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Ind J Med Res*, 120, 418-428.

Laraque F, Griggs A, Slopen M, Munsiff SS 2009. Performance of nucleic acid amplification tests for diagnosis of tuberculosis in a large urban setting. *Clin Infect Dis* 49:46–54.

Lira LAS, Santos FCF, Carvalho MSZ, Montenegro RA, Lima JFC, Schindler HC, Montenegro ML 2012. Evaluation of a IS6110-Taqman real-time PCR assay to detect *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples of patients with pulmonary TB. *Journal of Applied Microbiology* 114, 1103-1108.

Lok KH, Benjamin WH Jr, Kimerling ME, Pruitt V, Lathan M, Razeq J, Hooper N, Cronin W, Dunlap NE 2002. Molecular differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains without IS6110 insertions. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 8, no.11, pp. 1310–1313.

Marín M, Garcia de Viedma D, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E 2004. Rapid direct detection of multiple rifampin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by real-time PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4293–4300.

Michelon CT, Rosso F, Schmid KB, Sperhacke RD, Oliveira MM, Kritski AL, Rezende Jr L, Costa ER, Ribeiro AW, Verza M, Cafrune PI, Silva MSN, Kuhleis D,

Zaha A, Rossetti MLR 2011. Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. Mem Inst Oswaldo Cruz, 106(2):194-199.

Miller MB, Popowitch EB, Backlund MG, Ager PCE 2011. Performance of Xpert MTB/RIF RUO Assay and IS6110 Real-Time PCR for *Mycobacterium tuberculosis* Detection in Clinical Samples. Journal of Clin Microbiology, p. 3458–3462 Vol. 49, No. 10.

MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde 2008. Manual Nacionalde Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Departamento de Vigilância Epidemiológica.

Nocker A, Cheung CY, Camper AK 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. Journal of Microbiological Methods 67, 310–320.

Pai M, Flores LL, Hubbard A, Riley LW, Colford JM Jr 2004. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis 4: 6.

Park KS, Kim JY, Lee JW, Hwang YY, Jeon K, Koh WJ, Ki CS, Lee NY 2013. Comparison of the Xpert MTB/RIF and COBAS TaqMan MTB assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. J Clin Microbiol 01335-13.

Piersimoni C, Scarparo C 2003. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. J Clin Microbiol 41:5355–5365.

Siddiqi K, Lambert ML, Walley J 2003. Clinical diagnosis of smear negative pulmonary tuberculosis in low-income countries: the current evidence. Lancet Infect Dis 3: 288-296.

Shinu P, Nair A, Singh V, Kumar S, Bareja, R 2011. Evaluation of rapid techniques for the detection of mycobacteria in sputum with scanty bacilli or clinically evident, smear negative cases of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz 106, 620–624.

Singh A, Kashyap VK 2012. Specific and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Samples by Polymerase Chain Reaction. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases 654694, 5 p.

Tanaka MM, Rosenberg NA, Small PM 2004. The control of copynumber of IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol. Biol. Evol. 21:2195–2201.

Weyer K, Mirzayev F, Migliori GB, Van Gemert W, D'Ambrosio L, Zignol M, Floyd K, Centis R, Cirillo DM, Tortoli E, Gilpin C, de Dieu Iragena J, Falzon D, Raviglione M 2013. Rapid molecular TB diagnosis: evidence, policy making and global implementation of Xpert MTB/RIF. Eur Respir J 42: 252–271.

WHO – World Health Organization 2014. [Internet]. [cited March 2014]. WHO Fact sheet N°104. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>.

WHO – World Health Organization 2014. Tuberculosis Country Profiles 2013. Global Tuberculosis Report 2013. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

Yang YC, Lu PL, Huang SC, Jenh YS, Jou R, Chang TC 2011. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB Test for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens. Journal of Clin Microbiology, p. 797–801 Vol. 49, No. 3.

Figures and legends:

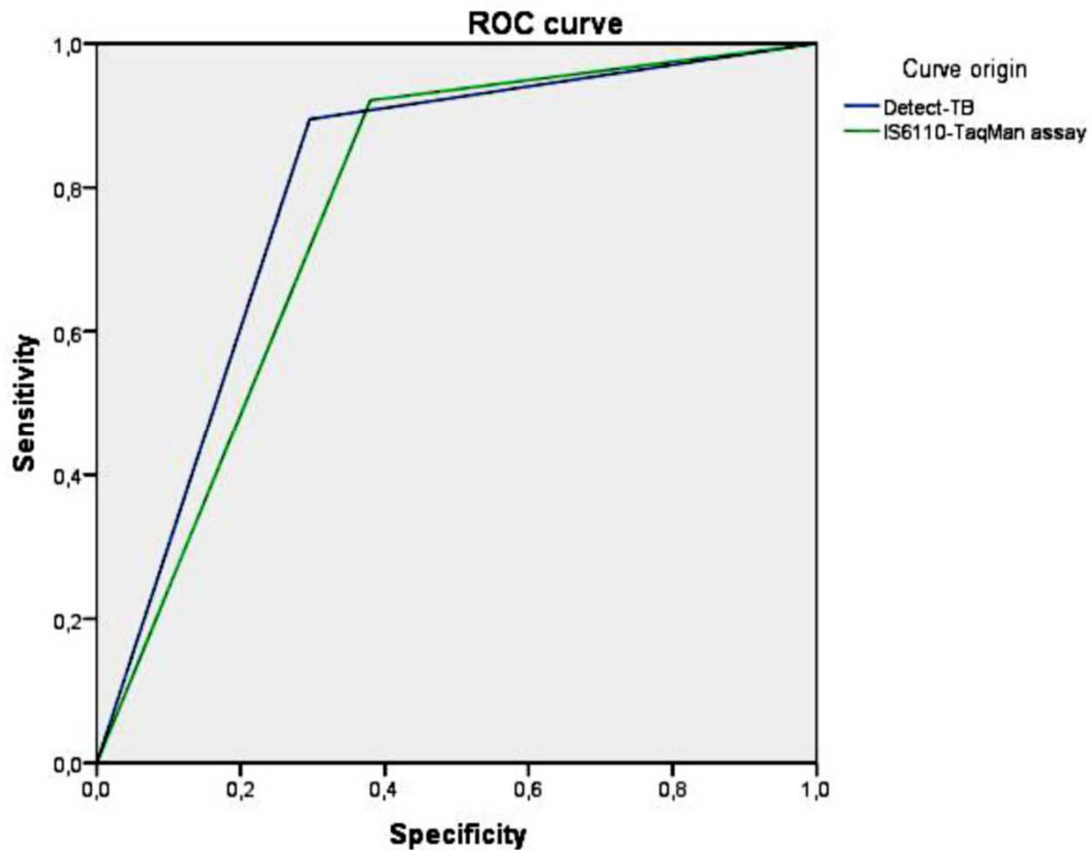


Figure 1. ROC curve for the Detect-TB and the IS6110-TaqMan assay compared with the smear microscopy and/or culture. The area under the curve for the Detect-TB was 0.799 ($P < 0.001$). The area under the curve for the IS6110-TaqMan assay was 0.770 (P value < 0.001). Sensitivity was 89.4% and specificity 70.4%.

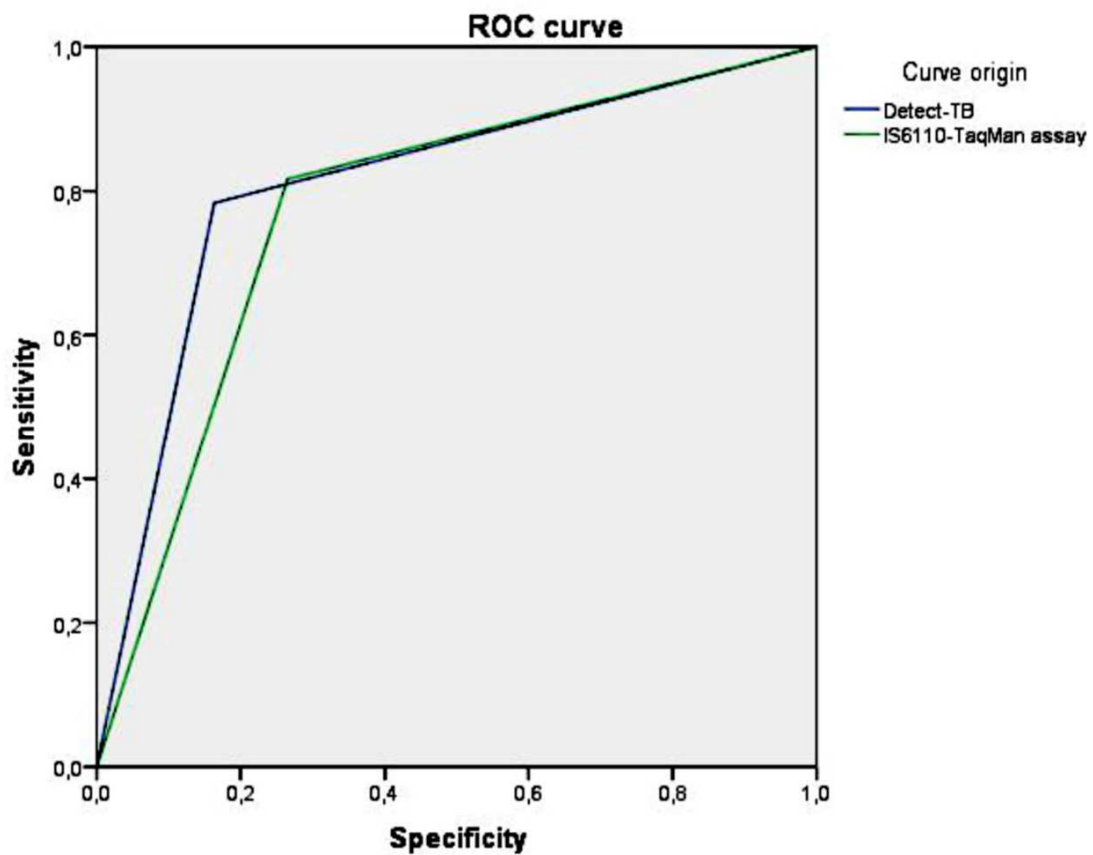


Figure 2. ROC curve for the Detect-TB and the IS6110-TaqMan assay compared with the clinical outcome. The area under the curve for the Detect-TB was 0.810 ($P < 0.001$). The area under the curve for the IS6110-TaqMan assay was 0.776 ($P < 0.001$). Sensitivity was 86.6% and specificity 66.4%.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, o diagnóstico e tratamento da TB ativa são as estratégias mais importantes dos programas de controle da TB. Mundialmente, há um elevado número de pacientes com TB ativa sem serem detectados. Em uma população onde a TB é uma doença de alta prevalência, a busca por um diagnóstico mais rápido e por metodologias de diagnóstico mais precisas é crucial. O principal objetivo deste estudo foi comparar duas metodologias moleculares com potencial para serem implementadas na rotina laboratorial, o Detect-TB (Labtest, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e o ensaio TaqMan-IS6110.

Neste estudo, a análise dos dados foi realizada de duas maneiras. Em primeiro lugar, considerando-se a baciloscopia e/ou cultura como padrão-ouro, e em segundo lugar, considerando-se o desfecho clínico como padrão-ouro. Ao considerar a baciloscopia e/ou a cultura como padrão-ouro (n= 109), 34 das 38 amostras positivas para a baciloscopia e/ou cultura foram positivas para o Detect-TB e 4 foram falso-negativas (FN). Das 71 amostras negativas para a baciloscopia e/ou cultura, 50 foram negativas para o Detect-TB e 21 falso-positivas (FP). O Detect-TB detectou o DNA de *M. tuberculosis* em 21 amostras de pacientes cujos testes convencionais (baciloscopia e cultura) foram negativos. Destas, 15 amostras também foram positivas para o ensaio TaqMan-IS6110 e 2 amostras também apresentaram desfecho clínico positivo. Considerando-se apenas a baciloscopia, o Detect-TB identificou 4 amostras positivas para a cultura que a baciloscopia não. Destas 4 amostras FN para a baciloscopia, 2 foram negativas para o desfecho clínico. Para o ensaio TaqMan-IS6110, 35 amostras foram positivas (de 38 positivas para a baciloscopia e/ou cultura), 44 negativas (de 71 negativas para a baciloscopia e/ou cultura), 3 foram FN, e 27 FP. O ensaio TaqMan-IS6110 detectou o DNA de *M. tuberculosis* em 27 amostras de pacientes cujos testes convencionais (baciloscopia e cultura) foram negativos. Destas, 2 amostras apresentaram desfecho clínico positivo. Considerando-se apenas a baciloscopia, o ensaio TaqMan-IS6110 identificou 4 amostras positivas para a cultura que a baciloscopia não. Destas 4 amostras, 3 foram negativas para o

desfecho clínico. Das 6 amostras com baciloscopia negativa, mas cultura positiva, o Detect-TB identificou 4 destas, enquanto o ensaio de TaqMan-IS6110 identificou 5. Isto sugere que o Detect-TB e o ensaio TaqMan-IS6110 são capazes de identificar amostras positivas, mas com baciloscopia e desfecho clínico negativos. Os testes moleculares podem detectar o DNA do patógeno mesmo depois de a doença ter sido erradicada, levando a resultados FP (ASSUNÇÃO *et al.*, 2014). Por conseguinte, os testes moleculares não devem ser utilizados em pacientes com histórico de tratamento anterior ou em tratamento para a TB. O Detect-TB visa apenas o diagnóstico molecular da doença e não o monitoramento do tratamento da TB, conforme descrito pelas instruções do fabricante. Como não foi possível acessar as informações de tratamento prévio de todas as amostras dos pacientes envolvidos neste estudo, é possível inferir que, provavelmente, algumas amostras não excluídas do estudo podem ter sido coletadas de pacientes previamente tratados ou em tratamento para TB, gerando resultados FP. Por este motivo, todas as amostras com a informação de tratamento anterior ou em andamento (n= 19) foram excluídas da análise de dados de ambos os ensaios.

Ao considerar o desfecho clínico como padrão-ouro (n= 197), das 60 amostras positivas para o desfecho clínico, 52 foram positivas para o Detect-TB e 8 foram FN. Das 137 amostras negativas para o desfecho clínico, 91 foram negativas para o Detect-TB e 46 foram FP. Para o ensaio TaqMan-IS6110, 56 foram positivas, 4 FN, 76 negativa e 61 FP. Da mesma forma que quando a baciloscopia e/ou cultura foram consideradas como padrão-ouro, foi observado um grande número de amostras FP. Evidentemente, isso não era esperado, mas considerando que os testes moleculares podem ser mais sensíveis do que os testes microbiológicos de rotina para o diagnóstico da TB, isso pode revelar um aumento na detecção de casos de TB. Considerando o ensaio TaqMan-IS6110, das 27 amostras FP para baciloscopia e/ou cultura, 25 amostras FP apresentaram valores de *Threshold cycle value* (C_T) acima de 35, o que pode indicar a presença de pequenas quantidades de DNA de *M. tuberculosis* nestas amostras. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a tecnologia TaqMan de PCR em tempo real foram descritas como metodologias moleculares de SE e SP mais elevadas quando comparadas aos métodos diagnósticos convencionais e buscam reduzir o

tempo necessário para o diagnóstico da TB (KATOCH, 2004). Embora a baciloscopia seja o método mais utilizado para o diagnóstico da TB pulmonar e um teste de baixo custo, a SE é cerca de 45-80% em casos de TB pulmonar confirmados pela cultura. Aproximadamente, apenas 40-50% dos pacientes com TB pulmonar apresentam baciloscopia positiva, uma vez que o escarro deve conter pelo menos 5.000 bacilos/mL para ser detectável pela baciloscopia (SIDDIQI *et al.*, 2003). Atualmente, a cultura é o teste mais sensível disponível para o diagnóstico da TB. No entanto, pode exigir de 2 a 8 semanas para o isolamento de *M. tuberculosis* a partir de uma amostra clínica e pode apresentar resultados FN em 10-20% dos casos (PAI *et al.*, 2004). Por outro lado, os testes moleculares podem detectar 50 a 80% dos casos posteriormente confirmados por cultura e fornecem resultados em horas (CDC, 2009).

É importante ressaltar que há pouca informação sobre as amostras envolvidas neste estudo, como o histórico de tratamento anterior de TB ou tratamento em andamento de todos os pacientes envolvidos neste estudo – o que pode ser inferido como uma limitação do trabalho. Assim, a alta taxa de amostras FP neste estudo provavelmente pode estar relacionada com a inclusão de amostras de pacientes com histórico de tratamento anterior ou em tratamento para a TB, uma vez que não foi possível obter esses dados de todos os pacientes incluídos neste estudo. Além disso, uma parte dos resultados FP pode ser devida à presença de DNA de *M. tuberculosis* nas amostras, mas a ausência de bactérias viáveis para o crescimento em cultura. Testes diagnósticos baseados na detecção de DNA tendem a superestimar o número de células vivas, devido à relativamente longa persistência do DNA após a morte celular (NOCKER *et al.*, 2006). Apesar de uma sala separada ter sido utilizada, incluindo um fluxo de trabalho desde o início da PCR até a hibridização, alguns resultados FP também podem ser explicados pela possível contaminação com amostras verdadeiras positivas ou amplicons de PCR.

Em algumas populações específicas, como HIV positiva, a SE dos testes moleculares pode ser muito menor, o que resulta num grande número de amostras FN. Neste estudo, não foi possível acessar informações quanto à

presença de HIV nos pacientes. Homogeneização ineficiente também pode ter contribuído para o número de amostras FN e a ausência de DNA nos pequenos volumes amostrais aliqüotados para o teste. A sequência IS6110 está presente em múltiplas cópias no genoma bacteriano, mas algumas cepas de certas partes do mundo, não o possuem (LOK *et al.*, 2002). Isso pode ter causado alguns resultados FN, o que pode ter afetado um pouco a SE dos ensaios. Uma possível solução para este problema seria amplificar mais de uma sequência alvo. Para o ensaio TaqMan-IS6110 foi utilizado um controle interno de amplificação, portanto, foi possível descartar resultados FN, devido à presença de inibidores da enzima TaqDNA polimerase. O controle interno utilizado emite uma fluorescência diferente da sonda alvo e a falha de amplificação pode ser detectada. Resultados negativos para a baciloscopia podem ter ocorrido devido à presença de poucas bactérias nas amostras, enquanto os resultados negativos para a cultura podem ser explicados pela inibição de crescimento microbiológico.

A SE e SP do Detect-TB em comparação com a baciloscopia e/ou cultura foi de 89,4% (IC= 83,1-95,6) e 70,4% (IC= 61,4-79,4), respectivamente. Quando o Detect-TB foi comparado com o desfecho clínico, a SE foi de 86,6% (IC= 81,6-91,6) e SP de 66,4% (IC= 59,5-73,2), respectivamente. A SE e SP do ensaio TaqMan-IS6110 em comparação com a baciloscopia e/ou cultura foi de 92,1% (IC= 86,6-97,6) e de 62,0% (IC= 52,4-71,6), respectivamente. Quando o ensaio TaqMan-IS6110 foi comparado com o desfecho clínico, a SE foi de 93,3% (IC= 89,5-97,0) e SP 55,5% (IC= 48,3-62,7), respectivamente. De acordo com a Figura 1, quando o Detect-TB e o ensaio TaqMan-IS6110 foram comparados com a baciloscopia e/ou cultura, a área sob a curva ROC para o Detect-TB foi de 0,799 ($P < 0,001$), um valor ligeiramente superior do que a encontrada para o ensaio TaqMan-IS6110, que foi de 0,770 ($P < 0,001$). Quando comparados com o desfecho clínico, a área sob a curva ROC para o Detect-TB foi de 0,810 ($P < 0,001$), enquanto que a área sob a curva para o ensaio TaqMan-IS6110 foi de 0,776 ($P < 0,001$), o que pode ser visto na Figura 2. Embora neste estudo os níveis de SE tenham sido consistentes ou ligeiramente mais elevados, os níveis de SP foram inferiores aos estudos previamente relatados de testes *in house* e kits comerciais (ANTONENKA *et al.*, 2013; ARMAND *et al.*, 2011; LIRA *et al.*,

2012; MILLER *et al.*, 2011; SIDDIQI *et al.*, 2003, SINGH & KASHYAP, 2012, WEYER *et al.*, 2013, YANG *et al.*, 2011). Em um trabalho anterior do nosso grupo, em que não foram incluídas amostras de pacientes com histórico de tratamento anterior ou em tratamento para TB, o Detect-TB apresentou SE e SP de 94% e 100%, respectivamente, em um grupo de 175 amostras de escarro espontâneo (MICHELON *et al.*, 2011). Valores baixos de SE podem resultar em resultados FN, com conseqüências adversas para taxas de morbidade e mortalidade e transmissão da doença. Já valores baixos de SP podem resultar em resultados FP, expondo os pacientes a tratamentos desnecessários, enquanto a causa subjacente da doença permanece sem diagnóstico (WEYER *et al.*, 2013).

A concordância entre o Detect-TB e o ensaio TaqMan-IS6110 foi demonstrada pelo índice Kappa de 0,56 ($P < 0,0001$), considerando-se o $n = 197$, o que demonstra concordância moderada entre os testes. Considerando-se o padrão-ouro como a baciloscopia e/ou cultura, o Detect-TB detectou 34 resultados positivos de 38 amostras positivas para baciloscopia e/ou cultura, enquanto que o ensaio TaqMan-IS6110 detectou 35 resultados positivos. Das 71 amostras negativas para a baciloscopia e/ou cultura, 50 foram negativas para o Detect-TB e 44 foram negativas para o ensaio TaqMan-IS6110. Considerando-se o padrão-ouro como o desfecho clínico, o Detect-TB detectou 52 amostras positivas de 60 amostras com desfecho clínico positivo, enquanto o ensaio TaqMan-IS6110 detectou 56 amostras positivas. Ambos os testes apresentaram alguns resultados conflitantes com o padrão-ouro, mas semelhantes entre eles. Além disso, ambos os testes apresentaram um elevado número de resultados FP e este número foi ainda maior para o ensaio TaqMan-IS6110 (27 contra 21 do Detect-TB, considerando a baciloscopia e/ou cultura como padrão-ouro, e 61 contra 46 do Detect-TB, considerando o desfecho clínico como padrão-ouro). Estes resultados podem ser explicados, em parte, pela SE superior dos testes moleculares (KATOCH, 2004). Portanto, outro fato que deve ser levado em consideração é que algumas amostras verdadeiras positivas podem não ter sido identificadas pela baciloscopia e cultura. Um total de 15 amostras apresentaram resultados FP, em ambos os ensaios moleculares. O ensaio TaqMan-IS6110 apresentou um bom limite de detecção, de 4,8 fg/ μ L do DNA molde, enquanto que o limite de detecção

do Detect-TB é de cerca de 50 unidades formadoras de colônias (UFC); este fato pode explicar o maior número de amostras FP do ensaio TaqMan-IS6110.

Atualmente, torna-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias, com resultados mais rápidos e mais precisos para a identificação de agentes infecciosos (FILHO & REMUALDO, 2007). Um diagnóstico rápido e confiável é necessário para o início do tratamento da TB, o que é essencial para reduzir a incidência da doença, assim como para reduzir os custos de tratamento pelo governo. Ambos os testes moleculares descritos neste estudo apresentam potencial para serem futuramente implementados na rotina, mas são necessários mais testes.

Neste trabalho, a população amostral inadequada e o pequeno n amostral geraram altos percentuais de resultados FP, afetando a qualidade dos resultados. Por estas razões, uma análise com um número maior de amostras faz-se necessário. No entanto, este estudo demonstra que o Detect-TB e o ensaio TaqMan-IS6110 podem ser ferramentas auxiliares para o diagnóstico da TB pulmonar ativa, quando utilizados em conjunto com os testes convencionais, contribuindo assim para aumentar a SE e SP do diagnóstico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDOUS, W. K.; POUNDER, J. I.; CLOUD, J. L.; WOODS, G. L. Comparison of Six Methods of Extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from Processed Sputum for Testing by Quantitative Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 2471–2473, 2005.

ANTONENKA, U.; HOFMANN-THIEL, S.; TURAEV, L.; ESENALIEVA, A.; ABDULLOEVA, M.; SAHALCHYK, E.; ALNOUR, T.; HOFFMANN, H. Comparison of Xpert MTB/RIF with ProbeTec ET DTB and COBAS TaqMan MTB for direct detection of *M. tuberculosis* complex in respiratory specimens. *BMC Infectious Diseases*, 13:280, 2013.

ARMAND, S.; VANHULS, P.; DELCROIX, G.; COURCOL, R.; LEMAÎTRE, N. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol*, 49, 1772–1776, 2011.

ASSUNÇÃO, T. M.; BATISTA, JR. E. L.; DEVES, C.; VILLELA, A. D.; PAGNUSSATTI, V. E.; DIAS, A. C. O.; KRITSKI, A.; RODRIGUES-JUNIOR, V.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. Real time PCR quantification of viable *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples treated with propidium monoazide. *Tuberculosis*, 94421-427, 2014.

BALASINGHAM, S. V.; DAVIDSEN, T.; SZPINDA, I.; FRYE, S. A.; TONJUM, T. Molecular diagnostics in tuberculosis: basis and implications for therapy. *Mol Diagn Ther*, 13:137–151, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/743-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/tuberculose/l2-tuberculose/11940-publicacoes-tuberculose>, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Departamento de Vigilância Epidemiológica, p. 1-458, 2008.

BRENNAN, P. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Bioche*, v. 64, p. 29-65, 1995.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N.; JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBREG, E. A. *Med. Microbiol*, 20 ed., 1995.

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

CEVS-SES. Secretaria Estadual de Vigilância Sanitária, Secretaria Estadual da Saúde. Dados preliminares, sujeitos a revisão - SINAN 27/05/2013. *PECT/RS-TB Monitoramento e Avaliação RS*, 2013.

CHENG, V. C.; YEW, W. W.; YUEN, K. Y. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 24: 711–720, 2005.

DANIEL, T. M. The History of Tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100(11): 1862-1870, 2006.

DROUILLON, V.; LAGRANGE, P. H.; HERRMANN J.-L. Molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis by automated extraction and real-time PCR on non-decontaminated pulmonary specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 26:291–293, 2007.

EISENACH, K. D.; CAVE, M. D.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Inf Dis*, 161: 977-981, 1990.

ESPY, M. J.; UHL, J. R.; SLOAN, L. M.; BUCKWALTER, S. P.; JONES, M. F.; VETTER, E. A.; YAO, J. D.; WENGENACK, N. L.; ROSENBLATT, J. E.; COCKERILL, F. R.; SMITH, T. F. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol*, 19:165–256, 2006.

EVANS, J. T.; PARVEEN, A.; SMITH, G. E.; XU, L.; CHAN, E. W. C.; CHAN, R. C. Y.; HAWKEY, P. M. Application of denaturing HPLC to rapidly identify rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in low- and high-prevalence areas. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, 295–301, 2008.

FILHO, M. A. & REMUALDO, V. *Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico de Doenças Infecciosas. Prática Hospitalar*, v.53, p. 33-35, 2007.

FLORES, L. L.; PAI, M.; JUNIOR, C. M. J.; RILEY, W. L. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiology*, 5:55, 2005.

GUTIERREZ, M. C.; BRISSE, S.; BROSCHE, R.; FABRE, M.; OMAÏS, B.; MARMIESSE, M.; SUPPLY, P.; VINCENT, V. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*, 1(1): e5, 2005.

HONORE-BOUAKLINE, S.; VINCENSINI, J-P.; GIACUZZO, V.; LAGRANGE, P. H.; HERRMANN, J-L. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *J Clin Microbiol*, 41:2323–2329, 2003.

KATOCH, V. M. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Ind J Med Res*, 120, 418-428, 2004.

KENT, P. & KUBICA, G. *Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, p. 57-69, 1985.

KOCAGOZ, T.; SARIBAS, Z.; ALP, A. Rapid Determination of Rifampin Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 4:6015–6019, 2005.

KRITSKI, A. L.; CONDE, M. B.; MUZY DE SOUZA, G.R. *Tuberculose. Do Ambulatório à Enfermaria*. 2ª edição. São Paulo. Atheneu, 2000.

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

LING, I. D.; FLORES, L. L.; RILEY, W. L.; PAI, M. Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression. *Plos One*, 3(2): e1536: 10.1371, 2008.

LIRA, L. A. S.; SANTOS, F. C. F.; CARVALHO, M. S. Z.; MONTENEGRO, R. A.; LIMA, J. F. C.; SCHINDLER, H. C.; MONTENEGRO, M. L. Evaluation of a IS6110-Taqman real-time PCR assay to detect *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples of patients with pulmonary TB. *Journal of Applied Microbiology*, 114, 1103-1108, 2012.

LOK, K. H.; BENJAMIN, W. H. JR.; KIMERLING, M. E.; PRUITT, V.; LATHAN, M.; RAZEQ, J.; HOOPER, N.; CRONIN, W.; DUNLAP, N. E. Molecular differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains without IS6110 insertions. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 8, no.11, pp. 1310–1313, 2002.

MARÍN, M.; GARCIA, D. E.; VIEDMA, D.; RUIZ-SERRANO, M. J.; BOUZA, E. Rapid direct detection of multiple rifampin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by real-time PCR. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:4293–4300, 2004.

MICHELON, C. T.; ROSSO, F.; SCHMID, K. B.; SPERHACKE, R. D.; OLIVEIRA, M. M.; KRITSKI, A. .; REZENDE, JR. L.; COSTA, E. R.; RIBEIRO, A. W.; VERZA, M.; CAFRONE, P. I.; SILVA, M. S. N.; KUHLEIS, D.; ZAHA, A.; ROSSETTI, M. L. R. Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(2):194-199, 2011.

MILLER, M. B.; POPOWITCH, E. B.; BACKLUND, M. G.; AGER, P. C. E. Performance of Xpert MTB/RIF RUO Assay and IS6110 Real-Time PCR for *Mycobacterium tuberculosis* Detection in Clinical Samples. *Journal of Clin Microbiology*, p. 3458–3462 Vol. 49, No. 10, 2011.

MOKADDAS, E. & AHMAD, S. Development and evaluation of a multiplex PCR for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex members from non-tuberculous mycobacteria. *J. Infect. Dis*, 60 (2-3):140-4, 2007.

NOCKER, A.; CHEUNG, C. Y.; CAMPER, A. K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 310–320, 2006.

PAI, M.; FLORES, L. L.; HUBBARD, A.; RILEY, L. W.; COLFORD, J. M. JR. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*, 4: 6, 2004.

PALOMINO, C. P.; LEÃO, C. S.; RITACCO, V. Tuberculosis 2007: from basic science to patient care. 1a ed. *TuberculosisTextbook.com*, 687P, 2007.

PARASHAR, D.; CHAUHAN, D. S.; SHARMA, V. D.; KATOCH, V. M. Applications of real time PCR technology to mycobacterial research. *Indian Journal Medicine Research*, 124:385-398, 2006.

PARK, K. S.; KIM, J. Y.; LEE, J. W.; HWANG, Y. Y.; JEON, K.; KOH, W. J.; KI, C. S.; LEE, N. Y. Comparison of the Xpert MTB/RIF and COBAS TaqMan MTB assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*, 01335-13, 2013.

PIERSIMONI, C. & SCARPARO, C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *J Clin Microbiol*, 41:5355–5365, 2003.

ROTH, A.; FISCHER, M.; HAMID, E. M.; MICHALKE, S.; LUDWIG, W.; MAUSCH, H. Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria Based on 16S-23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:139-147, 1998.

SHINU, P.; NAIR, A.; SINGH, V.; KUMAR, S.; BAREJA, R. Evaluation of rapid techniques for the detection of mycobacteria in sputum with scanty bacilli or

clinically evident, smear negative cases of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106, 620–624, 2011.

SHRESTHA, N. K.; TUOHY, M. J.; HALL, G. S.; REISCHL, U., GORDON, S. M.; PROCOP, G. W. Detection and Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacterial Isolates by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:5121–5126, 2003.

SIDDIQI, K.; LAMBERT, M. L.; WALLEY, J. Clinical diagnosis of smear negative pulmonary tuberculosis in low-income countries: the current evidence. *Lancet Infect Dis*, 3: 288-296, 2003.

SINGH, A. & KASHYAP, V. K. Specific and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Samples by Polymerase Chain Reaction. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 10.1155, 2012.

STOUT, E. J.; HOPKINS, W. G.; MCDONALD, R. J.; QUINN, A.; HAMILTON, D. C.; RELLER, B. L.; FROTHINGHAM, R. Association between 16S-23S Internal Transcribed Spacer Sequence Groups of *Mycobacterium avium* Complex and Pulmonary Disease. *J Clin Microbiol.*, 46(8): 2790–2793, 2008.

TANAKA, M. M.; ROSENBERG, N. A.; SMALL, P. M. The control of copy number of IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Biol. Evol*, 21:2195–2201, 2004.

TRNKA, L.; DANKOVA, D.; ZITOVA, J.; CIMPRICHOVA, L.; MIGLIORI, G. B.; CLANCY, L.; ZELLWEGER, J. P. Survey of BCG vaccination policy in Europe: 1994-96. *Bulletin of the World Health Organization*, 76(1):85-91, 1998.

WEYER, K.; MIRZAYEV, F.; MIGLIORI, G. B.; VAN GEMERT, W.; D'AMBROSIO, L.; ZIGNOL, M.; FLOYD, K.; CENTIS, R.; CIRILLO, D. M.; TORTOLI, E.; GILPIN, C.; DE DIEU IRAGENA, J.; FALZON, D.; RAVIGLIONE, M. Rapid molecular TB diagnosis: evidence, policy making and global implementation of Xpert MTB/RIF. *Eur Respir J*, 42: 252–271, 2013.

WHO – World Health Organization. WHO Fact sheet N°104. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>, 2014 a.

WHO – World Health Organization. Tuberculosis Country Profiles 2013. Global Tuberculosis Report 2013. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/, 2014 b.

YANG, Y. C.; LU, P. L.; HUANG, S. C.; JENH, Y. S.; JOU, R.; CHANG, T. C. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB Test for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens. *Journal of Clin Microbiology*, p. 797–801 Vol. 49, No. 3, 2011.

ZHANG, Y.; ZHANG, D.; LI, W.; CHEN, J.; PENG, W.; CAO, W. A novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe. *Nucleic Acids Research*, 31: 20-123, 2003.

Apêndice 1

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Escopo e política

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz é uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da medicina tropical (incluindo patologia, epidemiologia de campo e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética relacionada a essas áreas. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão somente através de convite. A revista publica oito números regulares, constituindo um por ano. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são publicados como suplementos. Os artigos apresentados devem ser escritos em inglês. Inglês de baixa qualidade é a principal causa de atraso na publicação; então, sugerimos aos autores que tenham inglês como língua estrangeira submeterem seus manuscritos à verificação de alguém com o inglês como língua nativa e, preferencialmente, seja um cientista da área. A submissão de um manuscrito às Memórias requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores. Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação do material.

Formato e estilo

O manuscrito deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, paginado, figuras legendadas e referências. As margens devem ser de pelo menos 3 cm. As figuras deverão vir na extensão tiff, com resolução mínima de 300 dpi. Tabelas e legendas de figuras devem ser submetidas juntas em único arquivo. Somente figuras deverão ser encaminhadas como arquivo suplementar.

O MANUSCRITO DEVE SER ORGANIZADO NA SEGUINTE ORDEM:

Título resumido: com até 40 caracteres (letras e espaços).

Título: com até 250 caracteres.

Autores: sem títulos ou graduações.

Afiliação institucional: nome do autor, seção, departamento, laboratório, instituição e localização geográfica (cidade, estado e país); endereço completo somente do autor correspondente.

Resumo: com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves). Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do Index Medicus.

Fonte de financiamento: Indicar as fontes de apoio financeiro e a mudança de endereço.

Introdução: deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, além de especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e Métodos: deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2008. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: devem oferecer uma descrição concisa das novas descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética, de acordo com o sobrenome do primeiro autor.

NO TEXTO USE O SOBRENOME DOS AUTORES E A DATA:

Lutz (1910) ou (Lutz 1910)

Com dois autores, é:

(Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912)

Quando há mais de dois autores, somente o primeiro é mencionado:

Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

Ao final do trabalho, use os seguintes estilos de referências:

REVISTAS

1. Artigo de periódico padrão

1.1. Impresso

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL 2002. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. N Engl J Med 25: 284-287.

1.2. On line

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL 2002. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 25: e12140307.

1.3. DOI

Zhang M, Holman CD, Price SD, Sanfilippo FM, Preen DB, Bulsara MK 2009. Comorbidity and repeat admission to hospital for adverse drug reactions in older adults: retrospective cohort study. *BMJ* doi: 10.1136/bmj.a2752.

2. Organização como autor

Diabetes Prevention Program Research Group 2002. Hypertension, insulin and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension* 40: 679-686.

3. Autores pessoais e organização como autor

Vallancien G, Emberton M, Harving N, van Moorselaar RJ, Alf-One Study Group 2003. Sexual dysfunction in 1,274 European men suffering from lower urinary tract symptoms. *J Urol* 169: 2257-2261.

4. Volume com suplemento

Geraud G, Spierings EL, Keywood C 2002. Tolerability and safety of frovatriptan with short and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache* 42 (Suppl. 2): S93-S99.

5. Artigo com errata publicada

Malinowski JM, Bolesta S 2000. Rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a critical review. *Clin Ther* 22: 1151-1168. Erratum in *Clin Ther* 2001 23: 309.

6. Artigo publicado eletronicamente antes da versão impressa

Yu WM, Hawley TS, Hawley RG, Qu CK 2002. Immortalization of yolk sac-derived precursor cells. *Blood* Nov 15 100: 3828-3831. Epub 2002 Jul 5.

LIVROS E OUTRAS MONOGRAFIAS

1. Autor pessoal

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA 2002. *Medical microbiology*, 4th ed., Mosby, St. Louis, 255 pp.

2. Capítulo em um livro

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM 2002. Chromosome alterations in human solid tumors. In B Vogelstein, KW Kinzler (eds.), *The genetic basis of human cancer*, McGraw-Hill, New York, p. 93-113.

3. Anais de Conferências

Harnden P, Joffe JK, Jones WG 2002. Germ cell tumours. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference, 2001 Sep 13-15, Leeds, UK, Springer, New York, 102 pp.

4. Dissertação e Tese

Borkowski MM 2002. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans, PhD Thesis, Central Michigan University, Michigan, 78 pp.

MATERIAIS NÃO PUBLICADOS

1. No prelo

Tian D, Araki H, Stahl E, Bergelson J, Kreitman M 2002. Signature of balancing selection in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, in press.

2. CD-ROM

Anderson SC, Poulsen KB 2002. Anderson's electronic atlas of haematology [CD-ROM]. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

3. Artigo de periódico na Internet

Abood S 2002. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [Internet] [cited 2002 Aug 12] 102. Available from: nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htmArticle.

ILUSTRAÇÕES

Figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

Figuras: as fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante, se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (8 cm) como na largura completa (16.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Como uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de Memórias, os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa.

Tabelas: devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

Apêndice 2

Currículo *vitae* resumido

Karen Barros Schmid

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Karen Barros Schmid.
Filiação José Ronaldo Schmid e Cristina Barros Schmid.
Nascimento 05/02/1986 - Porto Alegre/RS – Brasil.
Carteira de Identidade 8077254335 SSP - RS - 14/01/2008.
CPF 004.430.990-22.

Formação acadêmica/titulação

2011 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
Título: Comparação de Duas Metodologias Moleculares para o Diagnóstico de Tuberculose.
Orientador: Maria Lucia Rosa Rossetti.

2012 Especialização em Biomedicina Estética.
Instituto Cenecista de Ensino Superior de Santo Ângelo, IESA, Brasil.

2005 - 2010 Graduação em Biomedicina.
Centro Universitário Metodista, IPA-RS, Porto Alegre, Brasil
Título: Avaliação da Acurácia de um Método *in house* de Detecção Colorimétrica de DNA do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*.
Orientador: Rúbia Denise Ruppenthal.
Bolsista do(a): Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde.

Formação complementar

2009 - 2009 Extensão universitária em Biologia do Envelhecimento.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil.

2009 - 2009 Curso de curta duração em Garantia da Qualidade Laboratorial.
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, SBAC, Rio De Janeiro, Brasil.

- 2008 - 2008** Extensão universitária em Curso de Oncogenética. Sociedade Brasileira de Genética Médica, SBGM, Brasil.
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em IV Curso de Biologia Molecular Aplicada às C.. Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, FFFCMPA, Brasil.
-

Atuação profissional

1. Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

Vínculo institucional

- 2012 – Atual** Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Pesquisadora, Carga horária: 40, Regime: Integral.
- 2009 - 2012** Vínculo: Estágio/Trabalho voluntário, Enquadramento funcional: Estágio/Trabalho voluntário, Regime: Parcial.
- 2007 - 2009** Vínculo: Estágio extracurricular, Enquadramento funcional: Estágio extracurricular como bolsista de IC, Carga horária: 30, Regime: Dedicção exclusiva.
- 2006 - 2007** Vínculo: Estágio extracurricular, Enquadramento funcional: Estágio extracurricular voluntário, Regime: Parcial.

Prêmios e títulos

- 2008** Trabalho destaque no III Salão de Iniciação Científica e Extensão, Centro Universitário Metodista IPA
-

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. MICHELON, T. C., ROSSO, F., **SCHMID, K. B.**, SPERHACKE, R., OLIVEIRA, M. M., KRITSKI, A. L., REZENDE, L. Jr., COSTA, E. R., RIBEIRO, A. W., VERZA, M., CAFRUNE, P., SILVA, M. S. N., KUHLEIS, D., ZAHA, A., ROSSETTI, M. L. R.

Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for Mycobacterium tuberculosis detection. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso). , v.106, p.194 - 199, 2011.

2. SANTOS, C. R., ANGELI, S., MICHELON, T. C., **SCHMID, K. B.**, SILVA, M. S. N., ROSSETTI, M. L. R.

Detecção de DNA de Mycobacterium tuberculosis. Revista de Iniciação Científica da ULBRA. , v.8, p.84 - 90, 2010.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **SCHMID, K. B.**, RIBEIRO, A. W., MICHELON, T. C., KUHLEIS, D., CAFRUNE, P., ROSSETTI, M. L. R.

Avaliação da Acurácia de um Método de Detecção Colorimétrica de DNA de Mycobacterium tuberculosis In: XXI Salão de Iniciação Científica, XVIII Feira de Iniciação Científica e IV Salão UFRGS Jovem, 2009, Porto Alegre.

Livro de Resumos - XXI Salão de Iniciação Científica, XVIII Feira de Iniciação Científica e IV Salão UFRGS Jovem. , 2009.

2. **SCHMID, K. B.**, MICHELON, T. C., CAFRUNE, P., RIBEIRO, A. W., KUHLEIS, D., ROSSETTI, M. L. R.

Comparação de Dois Métodos de Detecção no Diagnóstico Molecular de Mycobacterium tuberculosis In: XX Salão de Iniciação Científica - XVII Feira de Iniciação Científica - III Salão UFRGS Jovem, 2008, Porto Alegre.

XX Salão de iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2008.

3. MICHELON, T. C., **SCHMID, K. B.**, ROSSO, F., SPERHACKE, R., ZAHA, A., ROSSETTI, M. L. R.

Desenvolvimento de uma Metodologia Molecular para o Diagnóstico de Tuberculose In: XX Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2008, Gramado.

XX Congresso Brasileiro de Genética Médica. , 2008.

4. RIBEIRO, A. W., KUHLEIS, D., CARMONA, J. M., **SCHMID, K. B.**, CAFRUNE, P., ZAHA, A., ROSSETTI, M. L. R.

Prevalência de Tuberculose na Penitenciária Estadual do Jacuí In: XX Salão de Iniciação Científica - XVII Feira de Iniciação Científica - III Salão UFRGS Jovem, 2008, Porto Alegre.

XX Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2008.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **SCHMID, K. B.**, BARCELLOS, R. B., VERZA, M., ROSSETTI, M. L. R.

Comparação entre PCR em Tempo Real e o Kit Detect-TB para Detecção de DNA do Complexo Mycobacterium tuberculosis, 2011. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

2. SCHMID, K. B., ROSSO, F., MICHELON, T. C., VERZA, M., SPERHACKE, R., GREGIANINI, S. T., OLIVAL, L., CONDE, B. M., ZAVASCKI, P. A., GUERRA, L. R., ZAHA, A., ROSSETTI, M. L. R.

Identificação de Tuberculose Pleural através de PCR em Tempo Real, 2011. (Outra, Apresentação de Trabalho).