



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

Thiago Milech de Assunção

**Otimização da tecnologia de fluorescência associada à Reação em Cadeia
da DNA Polimerase (PCR em tempo real) para diagnóstico molecular da
tuberculose.**

Porto Alegre

2011

Thiago Milech de Assunção

Otimização da tecnologia de fluorescência associada à Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR em tempo real) para diagnóstico molecular da tuberculose.

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Eraldo Luis Batista Jr.

Co-orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Porto Alegre

2011

THIAGO MILECH DE ASSUNÇÃO

Otimização da tecnologia de fluorescência associada à Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR em tempo real) para diagnóstico molecular da tuberculose.

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em _____ de _____
de _____

BANCA EXAMINADORA:

Silvia Dias de Oliveira - PUCRS (Relatora)

Denise Cantarelli Machado - PUCRS

Arthur Germano Fett-Neto - UFRGS

Porto Alegre

2011

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Eraldo, pelos brilhantes ensinamentos e pela disposição a ensinar não somente no período do mestrado, mas desde o meu início na pesquisa. Agradeço a confiança em mim depositada, a amizade e a ajuda durante esses anos.

Ao Prof. Diógenes Santiago Santos e ao Prof. Luiz Augusto Basso meu respeito e admiração. Agradeço os ensinamentos passados e a oportunidade de ingressar no Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional e assim possibilitar meu ingresso no mundo da pesquisa.

A Dra. Jocelei Chies, Dra. Cláudia Nunes e Dra. Gaby Renard por sempre estarem dispostas a ajudar e ensinar. Agradeço os conselhos nos momentos difíceis, apoio, incentivo, amizade e principalmente aos conhecimentos passados.

Agradeço aos meus colegas e amigos da empresa 4G Pesquisa e Desenvolvimento e do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, pela ajuda na realização deste trabalho e pelo companheirismo dentro e fora do laboratório. Agradeço em especial, a Daiana Renck, Candida Deves, José Eduardo Nunes e Valnês Rodrigues Junior por estarem sempre presentes, pelos conselhos, pelo carinho, pelos momentos divertidos e pela amizade incondicional que vou levar para o resto da minha vida.

Aos funcionários e pacientes do Hospital Sanatório Partenon que tiveram grande parte na realização deste trabalho.

Aos meus amigos pela descontração, alegrias, amor e por aceitarem minha ausência em alguns momentos.

Aos meus familiares Dora, Manoel, Arthur e Douglas pelo amor, carinho, dedicação e conforto que sempre me proporcionaram.

Resumo

Nos tempos atuais, os métodos mais utilizados no diagnóstico da Tuberculose (TB) promovem um atraso inaceitável na liberação dos resultados, um elevado número de resultados falso-negativo e muitos não são sensíveis para formas paucibacilares da doença. Este fato se torna crítico uma vez que pacientes infectados continuam não tratados na comunidade aumentando a probabilidade de transmissão da doença e agravo da epidemia, o que corrobora a necessidade de aprimoramento ou desenvolvimento de novas metodologias. Diante deste fato, propusemos implementar um diagnóstico de DNA quantitativo para tuberculose paucibacilar, permitindo uma rápida identificação e quantificação de bacilos viáveis do *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*) em amostras biológicas com o auxílio da PCR em Tempo Real (R-T PCR). A região intergênica do gene *inhA-mabA*, possui cópia única no genoma do *Mt* e devido à sua importância na biossíntese de ácidos micólicos, foi escolhida como região alvo para o desenho de *primers* e sondas específicos acoplados a fluoróforos (TaqMan). A construção de padrões de DNA sintéticos do *Mt* serviram como referência para a quantificação absoluta dos ácidos nucleicos, com alvo na região intergênica descrita acima. Eles foram amplificados do DNA genômico do *Mt* utilizando primers específicos, clonados e o DNA plasmidial foi purificado e quantificado para o desenvolvimento de uma curva padrão. Após a morte celular o DNA pode permanecer íntegro; assim, métodos de diagnóstico molecular podem superestimar o número real de células viáveis em uma amostra. Culturas de *Mt* H37Rv foram tratadas com diferentes concentrações de EMA e PMA, intercalantes de DNA que se ligam no DNA de células mortas tornando-o insolúvel e desta forma impedindo a sua amplificação. A concentração de 100µM de PMA foi escolhida para tratar amostras de escarro de pacientes em tratamento, ou com suspeita de TB. Nosso método de diagnóstico mostrou uma alta sensibilidade (96,1%) quando comparado a amostras de escarro com baciloscopia positiva e se mostrou 47% mais sensível que a coloração Ziehl-Neelsen para amostras com baciloscopia negativa.

Palavras-chave: diagnóstico; tuberculose; PCR em tempo real; viabilidade celular; baciloscopia; EMA; PMA.

Abstract

Diagnostic methods of TB, nowadays, are prone to delay in diagnosis, increased false negative results and are not sensitive to many forms of paucibacillary disease. The aforementioned are critical since the infected individuals remain untreated in the community, increasing the likelihood of disease transmission and epidemic aggravation, which urges the need of new diagnostic methods. In this context, the aims of this study were to implement a quantitative nucleic acid-based diagnostic test for paucibacillary tuberculosis, enabling the identification and quantification of viable *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) bacilli by fluorescence-assisted PCR, i.e., Real-Time PCR (R-T PCR). The intergenic region of the *inhA-mabA* gene, which is single copy gene, was chosen as the target region to design specific primers and probes conjugated with fluorophores (TaqMan), because of its importance in the biosynthesis of mycolic acids. The construction of synthetic DNA flanking the target region served as standards for absolute quantification of nucleic acids. The DNA can remain intact after cell death, thus molecular diagnostic methods may overestimate the real number of viable cells in a sample. Cultures of Mt H37Rv were treated with different concentrations of EMA and PMA, DNA intercalating dyes that bind to the DNA of dead cells, rendering it insoluble, thus hampering its isolation. The concentration of 100 μ M PMA was chosen to treat sputum samples from patients with TB. Our method of diagnosis showed a broad sensitivity (96.1%) when compared to samples of smear-positive sputum and it proved to be 47% more sensitive than Ziehl-Neelsen staining for smear-negative samples.

Keywords: diagnosis; tuberculosis; real time PCR; cell viability, smear; EMA; PMA.

Lista de abreviações

BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente

BCG - Bacillus Calmette-Guérin

EMA – Brometo de Etídio Monoazídico

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

inhA - *trans* Δ^2 -enoil-ACP (CoA) redutase

INH - Isoniazida

mabA - β -cetoacil-ACP (CoA) redutase

MDR-TB – Tuberculose Resistente a Múltiplas Drogas

Mt – *Mycobacterium tuberculosis*

OD₅₈₀ – Densidade Óptica a 580 nanômetros

OMS – Organização Mundial da Saúde

PMA – Propídio Monoazídico

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

R-T PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RIF - Rifampicina

TB – Tuberculose

XDR-TB – Tuberculose Extensivamente Resistentes a Drogas

ZN – Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ABREVIACÕES	8
1. Capítulo 1.....	11
1.1 Tuberculose.....	12
1.2 Aspectos Epidemiológicos.....	13
1.3 Agente Etiológico.....	15
1.4 Transmissão e Patogenia.....	16
1.5 Tratamento.....	18
1.6 Cepas Resistentes.....	19
1.7 Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar.....	20
1.7.1 Diagnóstico Clínico.....	20
1.7.2 Diagnóstico Radiológico.....	21
1.7.3 Técnica de Mantoux.....	22
1.7.4 Microscopia.....	23
1.7.5 Cultura.....	24
1.7.6 Identificação Molecular de <i>M. tuberculosis</i>	25
1.8 Reação em cadeia da DNA Polimerase em tempo real.....	26
1.9 Viabilidade Celular.....	28
1.10 Justificativa.....	30
1.11 Objetivos.....	31
1.11.1 Objetivo Geral.....	31
1.11.2 Objetivos Específicos.....	31

Capítulo 2	32
ARTIGO.....	33
Capítulo 3	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
REFERÊNCIAS	68
ANEXO	75
ANEXO 1.....	76
ANEXO 2.....	77
ANEXO 3.....	78
ANEXO 4.....	79
ANEXO 5.....	80

Capítulo 1

Introdução
Justificativa
Objetivos

1. Introdução

1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis*, que foi descoberto em 1882 por Robert Koch, sendo também conhecido como Bacilo de Koch (Ducati et al., 2006). Cerca de dois milhões de pessoas morrem anualmente em consequência desta enfermidade, estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com o bacilo na sua forma latente e, destes, 10% desenvolverão a doença ativa ao longo de sua vida (WHO, 2010).

Com a introdução de programas de controle da TB, reforçados pelo uso do tratamento antimicrobiano de forma eficaz, a doença tornou-se altamente controlada; porém, nunca foi erradicada (Ducati et al., 2006; WHO, 2010). A interrupção de séculos de declínio das taxas de casos de TB tornou-se evidente no fim dos anos 80 e abrangeu os EUA e alguns países europeus, devido ao aumento da pobreza em ambientes urbanos e à imigração de países com elevada incidência de TB (Raviglione et al., 1997). Outros fatores contribuem para o atual panorama da TB em nível mundial: a desestruturação do sistema de saúde, a pandemia do HIV, o empobrecimento da população mundial, a elevada taxa de abandono do tratamento anti-TB, o surgimento de multi-resistência, a falta de incentivos para pesquisas nesta área e a indisponibilidade de novas drogas, de novas vacinas e de novos testes de diagnóstico (Raviglione et al., 1997; Collins, 1993).

1.2 Aspectos Epidemiológicos

Atualmente, essa doença é considerada uma ameaça à saúde pública global, tornando-se a causa líder de morte em adultos devido a um único agente infeccioso, o *M. tuberculosis*. Segundo o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), a maioria dos novos casos de TB se concentram no Sudeste Asiático, na África e nas regiões ocidentais do Pacífico (35%, 30% e 20%, respectivamente) (**Figura 1**). Contudo, a taxa de incidência estimada na África Sub-Saariana é quase o dobro do Sudeste Asiático região com mais de 350 casos/100 000 habitantes. O Brasil passou da 16ª para a 17ª posição no ranking dos 22 países com maior registro de casos de tuberculose no mundo. No entanto, o índice de casos aumentou de 39 para 48 casos/100 mil habitantes, e ainda apresenta 94 mil casos de TB com 7,6 mil mortes devido à doença (WHO, 2010).

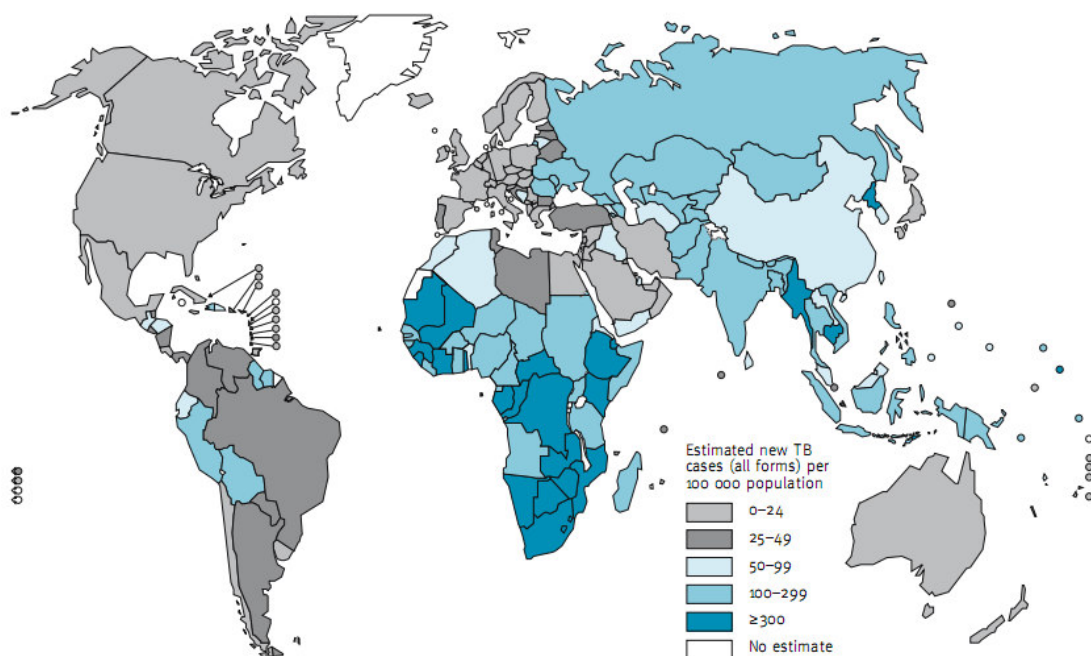


Figura 1 Número estimado de casos de tuberculose em 2009.
Fonte: Adaptado WHO, 2010.

O Rio Grande do Sul apresenta 22 municípios prioritários, que correspondem a uma cobertura de 27,5% do Programa de Controle da Tuberculose – PCT implantado no estado e 14,75% de cobertura da estratégia de tratamento supervisionado, uma das mais baixas do país. Em 2004, segundo a Secretaria Estadual do Rio Grande do Sul, foram registrados, no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), 4.377 novos casos de TB, representando 55,4% dos casos esperados. A incidência foi de 47,8 casos/100.000 habitantes para TB em todas as formas e uma incidência de 27,3 casos/100.000 habitantes para casos bacilíferos. A coorte de tratamento, considerando os municípios prioritários, mostrou uma cura de 70,5% estando abaixo de meta nacional de 85%. O abandono foi de 8,4%, óbitos devido à TB de 8,4% e casos não encerrados de 16,4%. A co-infecção TB-HIV foi de 7,2%, a maior taxa do país (Brasil, 2007).

Dados da OMS estimaram no ano de 2009, a ocorrência de 14 milhões de casos prevalentes da TB, 9,4 milhões de novos casos, com 1,68 milhões de mortes naquele ano, matando mais pessoas que a malária e AIDS juntas (WHO, 2010). Nesse cenário epidemiológico a co-infecção TB-HIV ocupa lugar de destaque devido ao seu grande impacto econômico e social; nestes pacientes o risco de desenvolver a TB após a infecção primária é substancialmente aumentado (Liberato et al., 2004), podendo ainda ocorrer a reativação de uma infecção latente (Nunn et al., 2005). Diversas evidências sugerem que a co-infecção TB-HIV seja responsável pelo aumento na incidência da TB em várias regiões do mundo. Nos países em desenvolvimento, a TB representa a infecção oportunista mais freqüente em pacientes HIV/AIDS (Narair, 2004). Aproximadamente 12% do total estimado

de casos incidentes de TB em 2009 eram de pacientes com a co- infecção do *M. tuberculosis* e o vírus HIV. A Região Africana apresentou aproximadamente 80% desses caso (WHO, 2010), pacientes com esta co-infecção apresentam uma clínica atípica que resulta em um diagnóstico incorreto e aumento da mortalidade (Morens et al., 2004).

1.3 Agente Etiológico

O *M. tuberculosis* é uma das espécies patogênicas do gênero *Mycobacterium* da família *Mycobacteriaceae*, apresenta-se na forma de um bacilo imóvel que não forma esporos e não produz toxinas, com dimensões de 0,2-0,7 x 1,0-10 µm, sendo um aeróbio estrito, cujo único hospedeiro é o ser humano. Ele possui um elevado conteúdo lipídico em sua parede celular que age na formação do granuloma, e sua grande quantidade de ácidos graxos o torna resistente à descoloração com álcool-ácido (Zahrt, 2003). O bacilo causador da TB é considerado um parasita intracelular que se estabelece preferencialmente nos pulmões, podendo apresentar-se também na forma extrapulmonar, afetando outros órgãos. O *M. tuberculosis* apresenta crescimento lento, e seu tempo de geração é de 18 a 20 horas, o que torna necessárias várias semanas para que colônias sejam visualizadas no meio de cultura (Bethlem et al., 1995).

O sequenciamento completo do genoma da linhagem *M. tuberculosis* H37Rv foi realizado em 1998 e permitiu a identificação de algumas características únicas do bacilo, como um cromossomo circular com 4.411.529 pares de bases, contendo em torno de 4 mil genes e um conteúdo rico em guanina e citosina (G + C) de 65,6%. O genoma ainda revela a organização

dos genes que codificam os componentes do sistema FAS-II, importante para a síntese de ácidos graxos. Em especial, no operon *inhA*, o gene *inhA* que codifica para uma *trans* Δ^2 -enoil-ACP (CoA) redutase (*inhA* – o alvo da ação da isoniazida) está localizado imediatamente abaixo do gene *mabA*, que codifica para uma β -cetoacil-ACP (CoA) redutase (MabA) (Cole et al., 1998).

Recentemente, foi demonstrado que a MabA metaboliza, preferencialmente, ácidos graxos de cadeia longa, consistente com o seu papel no alongamento de precursores de ácidos micólicos (Marrakchi et al., 2002). Assim, a enzima β -cetoacil redutase NADPH-dependente de *M. tuberculosis*, codificada pelo gene *mabA*, tem um papel importante no desenvolvimento do *M. tuberculosis*. Confirmando esta proposição, demonstrou-se, por meio de nocaute do gene *mabA*, que a atividade da MabA é essencial para a viabilidade do *M. tuberculosis* (Sacco et al., 2007).

1.4 Transmissão e Patogenia

A TB é uma doença de transmissão aérea, que ocorre a partir de um portador da TB pulmonar ativa. Ao tossir, espirrar ou falar, os bacilos presentes na secreção pulmonar são emitidos em gotículas microscópicas (gotículas de Wells) que, após sofrerem evaporação, deixam os bacilos livres podendo permanecer em suspensão no ar por algumas horas (Hopewell & Bloom, 1994; Musher, 2003). Os bacilos, uma vez inalados, podem alcançar os alvéolos pulmonares iniciando a infecção, ou podem ser eliminados por mecanismos de defesa do hospedeiro (Musher, 2003). Os casos suspeitos de TB pulmonar, sem expectoração ou com pesquisa direta bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) negativa no escarro espontâneo, denominados de paucibacilares,

constituem um problema particular, porém, de relevante magnitude, mesmo em países em desenvolvimento. No Brasil, cerca de 26,7% dos pacientes adultos são tratados como casos de TB pulmonar, sem confirmação bacteriológica, no momento da adoção da terapêutica.

No pulmão, as bactérias são fagocitadas por macrófagos alveolares induzindo uma resposta pro-inflamatória localizada. Desta forma, citocinas como o fator de necrose tumoral alfa e quimiocinas inflamatórias são secretados pelos macrófagos infectados conduzindo a um recrutamento celular para o local da infecção, o que resulta em um acúmulo de macrófagos (Kritski & Mello, 2007). Esse aglomerado celular forma o granuloma, também conhecido como tubérculo, característico da TB. Após 2 a 4 semanas da infecção, alguns macrófagos do hospedeiro desenvolvem uma habilidade para matar os bacilos contidos dentro deles; porém, outros começam a ser mortos pelos bacilos ou por seus produtos. Neste estágio, o granuloma forma um centro caseoso, onde o bacilo se localiza, podendo permanecer neste local até que ocorra a sua reativação (Dannenberg, 1989). No momento da formação da lesão caseosa, o hospedeiro torna-se reator à tuberculina, a primeira evidência clínica de que o indivíduo foi exposto ao agente infeccioso. Isto ocorre normalmente, de 1 a 2 meses após a exposição inicial, sendo uma resposta tecidual típica da fase de latência, onde não há sinais da doença e o hospedeiro não a transmite (Dannenberg, 1989; Musher, 2003).

O contato do *M. tuberculosis* com o hospedeiro pode levar à evolução rápida da doença (TB primária), que ocorre em cerca de 3 a 10% dos indivíduos infectados. Nos demais casos, o bacilo pode persistir no hospedeiro em estado de latência por um longo período, podendo reativar-se tardiamente

(TB pós-primária) devido a uma série de fatores, tais como: má nutrição, abuso de drogas, idade avançada, diabetes, imunodepressão e, principalmente, após infecção por HIV (Bethlem et al., 1995; Stewart et al., 2003).

1.5 Tratamento

O principal objetivo da quimioterapia em pacientes com TB é a erradicação de todos os bacilos ativos ou dormentes. Entre os métodos de controle disponíveis para *M. tuberculosis* estão o tratamento e diagnóstico precoces, o tratamento da latência e a vacinação por Bacillus Calmette-Guérin (BCG) (Basso & Blanchard, 1998). A atual vacina contra a TB, *Mycobacterium bovis* atenuado (BCG), foi introduzida há mais de 60 anos e ainda é utilizada em vários países do mundo. Esta vacina protege contra a manifestação severa da doença em crianças, mas não impede a reativação pulmonar em adultos ou o estabelecimento da forma latente do bacilo (Andersen, 2006)(Andersen 2006).

Nos anos 70, foi desenvolvido pelo Conselho de Medicina Inglês, o primeiro tratamento quimioterápico contra a TB; ele ocorre em duas fases, onde a primeira, fase de “curta duração”, consiste na combinação de agentes bactericidas potentes (isoniazida[INH], rifampicina[RIF], pirazinamida e etambutol ou estreptomicina) com duração de dois meses e a segunda fase, composta de duas drogas (INH e RIF) com duração de quatro meses adicionais (Ducati et al., 2006; Basso & Blanchard, 1998). Devido à longa duração do tratamento, à terapia inadequada e aos efeitos adversos causados pelos medicamentos (geralmente hepatotoxicidade, distúrbios gastrintestinais e neurológicos) alguns pacientes não completam o tratamento, levando ao

surgimento de cepas resistentes. Ademais, as drogas empregadas nos esquemas anti-TB fazem interações importantes com fármacos anti-retrovirais podendo levar a concentrações séricas diminuídas de alguns fármacos e/ou aumentar a toxicidade de outros (Koul et al., 2011).

1.6 Cepas Resistentes

A cada ano, cerca de 400 mil novos casos de TB resistente a múltiplas drogas (MDR-TB) são relatados, ocorrendo quando uma cepa de *M. tuberculosis* sofre mutação, tornando-se resistente à INH e à RIF, duas das mais potentes drogas de primeira linha utilizadas no tratamento da TB (WHO, 2010; Matteelli et al., 2007). Ao contrário da MDR-TB, que requer uma quimioterapia mais cara, prolongada e com efeitos colaterais mais severos, devido ao uso de drogas de segunda linha, as cepas denominadas XDR-TB (TB extensivamente resistentes a drogas) são intratáveis, sendo definidas como resistentes à INH e à RIF, e a pelo menos uma das três drogas injetáveis de segunda linha (capreomicina, canamicina e amicacina) e às fluoroquinolonas (Basso & Blanchard, 1998; Zager & McNerney, 2008). A OMS estima que 5% dos novos casos de TB sejam MDR-TB, e que aproximadamente 10% destes se tornem XDR-TB (WHO, 2010).

Embora RIF e INH sejam muito efetivas no tratamento da TB, cepas resistentes a estas drogas podem surgir rapidamente, em parte pela não aderência ao regime de múltiplas drogas ou ao abandono do tratamento (Ramirez et al., 2010). Estudos prévios demonstraram que 95% dos casos de resistência à RIF está associada a mutações em uma região do gene *rpoB* de 81-pb, denominada região determinante de resistência a RIF, enquanto

mutações no gene *katG* e na região promotora do gene *inhA* são frequentemente associadas à resistência à INH (Bravo et al., 2009).

Como medida de controle, a OMS implementou um procedimento padronizado para garantir o uso correto das drogas que compõem o tratamento da TB, o qual é conhecido como DOTS (tratamento supervisionado de curta duração, do inglês *directly observed treatment short-course*), no qual agentes de saúde acompanham todo o tratamento do paciente, monitorando periodicamente o uso correto dos medicamentos, a fim de impedir o abandono da quimioterapia e o possível surgimento de cepas multirresistentes (WHO, 2010; Matteelli et al., 2007).

1.7 Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar

A TB é considerada uma ameaça à saúde pública global; porém, os esforços para o controle desta doença têm-se centrado mais na cura e no desenvolvimento de novos fármacos do que sua detecção (Dye et al., 2003). Embora laboratórios de análises sejam essenciais para o controle e diagnóstico da doença, estes não recebem atenção suficiente nos países em desenvolvimento, e a baciloscopia ainda constitui o único método disponível para diagnosticar a TB (Steingart et al., 2006).

1.7.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico da TB segue o caminho da anamnese e do exame físico do paciente. Os sintomas comuns da TB são expectoração que pode ser purulenta ou mucóide, com ou sem sangue, febre vespertina, sem calafrios (não costuma ultrapassar os 38,5°C), sudorese noturna e a anorexia. O exame

físico geralmente mostra “fácies” de doença crônica e emagrecimento, embora indivíduos com bom estado geral e sem perda do apetite também possam ter TB pulmonar (WHO, 2010).

A história familiar, informações sociais, doenças anteriores e a história de contato prévio com pacientes portadores da doença, constituem dados importantes, que conduzem à formulação de hipóteses acerca do diagnóstico. É recomendado que o diagnóstico clínico seja confirmado com o auxílio de exames complementares, contudo, alguns pacientes podem ser diagnosticados com base apenas na forte suspeita clínica e resposta ao tratamento anti-TB, mesmo apresentando baciloscopia negativa (Chan et al., 2000).

1.7.2 Diagnóstico Radiológico

O exame radiográfico do tórax deve ser solicitado para todos os pacientes com suspeita de TB pulmonar. Este é um método de diagnóstico de grande importância na investigação da doença, uma vez que a TB causa anormalidades radiográficas na maioria dos pacientes. Porém, cerca de 15% dos casos de TB pulmonar não apresentam alterações radiológicas, principalmente pacientes imunodeprimidos (Burrill et al., 2007; Cattamanchi et al., 2008).

A TB primária e a TB pós-primária se manifestam clinicamente e radiologicamente de formas diferentes. A TB primária pode apresentar-se radiologicamente como um foco pulmonar e/ou um foco linfonodal homolateral apenas. A TB pós-primária é, praticamente, exclusiva do adulto, tendo localização preferencial pelos segmentos dorsais dos lobos superiores e pelos segmentos apicais dos lobos inferiores. Quanto maior a extensão da doença

maior a chance do paciente apresentar cavitação, geralmente sem nível hidroaéreo, com diâmetro médio de 2 cm e que não costuma ultrapassar 5 cm, transparente, circundado por uma parede fibrótica de espessura maior que 1 mm (Dunlap et al., 2000).

Embora o exame radiográfico de tórax seja de grande importância, achados radiográficos sem confirmação por outros métodos de triagem, não podem ser considerados positivos para TB, uma vez que várias doenças pulmonares produzem lesões semelhantes à TB. Desta forma, o exame radiográfico de tórax não confirma, nem descarta o diagnóstico, apenas indica a extensão da doença (Garay, 2004).

1.7.3 Técnica de Mantoux

A prova tuberculínica, avaliada através da técnica de Mantoux, é mais um método auxiliar para o diagnóstico de TB. Este teste baseia-se na reação celular desenvolvida após a inoculação intradérmica de um derivado protéico do *M. tuberculosis* (PPD RT 23). O teste tuberculínico positivo evidencia apenas a infecção por micobactérias, não caracterizando a presença da doença (Bethlem et al., 1995).

Resultados falso-positivos podem ocorrer em indivíduos infectados por outras micobactérias, vacinados pelo BCG ou pacientes com doenças que comprometem a imunidade celular (Lighter & Rigaud, 2009). A vacina BCG produz reações maiores e mais duradoras em pacientes vacinados (ou re-vacinados) após o primeiro ano de vida, esta reação tende a diminuir com o passar do tempo.

1.7.4 Microscopia

Atualmente, o método de microscopia de esfregaço de escarro, também denominado baciloscopia, é o método de diagnóstico mais empregado nos serviços de saúde para a TB, devido à sua simplicidade, rapidez e baixo custo. Ele consiste na visualização microscópica de BAAR em esfregaços de espécimes clínicos após coloração específica (Brasil, 2004). Porém, esta metodologia detecta apenas uma parte de todos os pacientes com cultura positiva para TB (WHO, 1998). Além disso, a baciloscopia tem pouca sensibilidade em pacientes com TB associada com HIV, um grupo que possui uma taxa alta de mortalidade a partir de TB com esfregaço negativo (Nunn et al., 2007).

O Ministério da Saúde (2008) recomenda a análise semiquantitativa dos esfregaços de espécime clínico. Os critérios para leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia realizadas em espécimes clínicos estão descritos no **quadro 1** (Brasil, 2008), o mesmo critério é adotado pela União Nacional Contra a Tuberculose e Doenças do Pulmão.

- não são encontrados BAAR em 100 campos = relata-se o resultado como NEGATIVO;
- são encontrados de 1 a 9 BAAR em 100 campos = relata-se apenas a quantidade de BAAR encontrada;
- são encontrados de 10 a 99 BAAR, em 100 campos = relata-se o resultado como POSITIVO +;
- é encontrada em média de 1 a dez BAAR por campo, nos primeiros 50 campos observados = relata-se o resultado como POSITIVO ++;
- é encontrada em média mais de dez BAAR por campo, nos primeiros vinte campos observados = relata-se o resultado como POSITIVO +++.

Quadro 1 – Critérios para Leitura e Interpretação dos Resultados da Baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen.

Fonte: Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, do Ministério da Saúde, 2008

1.7.5 Cultura

O isolamento do *M. tuberculosis* através da cultura de amostras clínicas é a metodologia que permite a confirmação do diagnóstico, sendo por isso considerado o padrão ouro para o diagnóstico da TB (Kent & Kubica, 1985). Os métodos clássicos para cultura de Micobactérias utilizam a sementeira da amostra clínica em meios de cultura sólidos ou líquidos. Os meios sólidos, como Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh, a base de ovo e Middlebrook 7H10 e 7H11, possuem a vantagem de ter menor custo e de apresentarem um índice de contaminação baixo. Porém, a desvantagem deste meio é o tempo de crescimento bacteriano que varia de 4 a 8 semanas, levando a um atraso no resultado do diagnóstico. Os meios líquidos, Middlebrook 7H9 e 7H12, tem como vantagem o crescimento mais rápido, porém contaminam mais facilmente e possuem um valor elevado para uso em rotina de laboratório (Furin & Johnson, 2005).

A cultura é capaz de detectar entre 10 e 100 bacilos viáveis por mililitro de secreção, sendo, portanto, mais sensível que a baciloscopia, além de permitir o isolamento da micobactéria, necessário para a identificação da espécie e para o teste de sensibilidade às drogas (Palomino, 2005). A sensibilidade da cultura varia entre 80% e 85% e sua especificidade é de 98% (Schirm et al., 1995).

O processamento da amostra clínica é um pré-requisito essencial para a cultura, visto que grande parte das amostras analisadas contém outros microrganismos além das micobactérias. A desproporção entre a velocidade de crescimento das micobactérias e das outras bactérias torna necessária uma descontaminação das amostras clínicas contendo microbiota associada, que,

quando presente, pode impedir a multiplicação dos bacilos levando a um resultado falso-negativo (Thornton et al., 1998). O uso de alguns agentes descontaminantes juntamente com agentes mucolíticos (utilizados para liquefazer os restos orgânicos e liberar os bacilos intracelulares) podem levar a uma perda de viabilidade do bacilo (Kent & Kubica, 1985).

1.7.6 Identificação Molecular de *M. tuberculosis*

Entre os diversos procedimentos utilizados para detectar o *M. tuberculosis*, como os anteriormente citados, ainda se destacam os métodos de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Este método é utilizado para fins de diagnóstico e tem se tornado uma ferramenta poderosa e cada vez mais popular devido à sua rapidez, sensibilidade e especificidade (Parashar et al., 2006). Clinicamente, isso se reflete na possibilidade de se obter diagnósticos mais precisos e rápidos, com a possibilidade de estabelecer-se também uma discriminação entre diferentes cepas bacterianas, com base em sequências nucleotídicas (Pao et al., 1990).

O principal método comercial designado para a detecção do *M. tuberculosis* é o AccuProbe[®] System (AccuProbe[®] *M. tuberculosis* Complex Culture Identification Test, Gen-Probe, CA, EUA) utiliza uma sonda genética baseada na unidade 16S do gene rDNA específico de micobactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*. Este método apresenta sensibilidade e especificidade elevadas (Badak et al., 1999).

Até o presente momento são limitados os estudos relatando o número de bacilos encontrados em amostras clínicas juntamente com detecção de DNA. A maioria das pesquisas está limitada à identificação do patógeno (Min et

al., 2010), diferenciação entre espécies do gênero *Mycobacterium* (Pao et al., 1990; Kraus et al., 2001) e mutações que conferem resistência a antibióticos (Moure et al., 2010; Massire et al., 2010; Ramirez et al., 2010). A sensibilidade de testes de PCR não-convencionais varia de 55,9% a 100% em vários estudos (Abe et al., 1993; Yajko et al., 1995; Min et al., 2010), tendo sido comprovada uma maior sensibilidade em amostras com resultado positivo para coloração Ziehl-Neelsen (ZN), do que para amostras com baciloscopia negativa (Desjardin et al., 1998).

1.8 Reação em cadeia da DNA Polimerase em tempo real

Métodos moleculares, como PCR oferecem uma detecção rápida, específica e sensível em amostras com infecções micobacterianas, utilizando sequencias específicas do DNA. O PCR em tempo real (R-T PCR) é um método *in vitro*, utilizado para a quantificação com precisão de moléculas de DNA, em um curto período de tempo, baseado no uso de uma sonda fluorescente de oligonucleotídeos, que permite correlacionar a intensidade do sinal coletado com a quantidade de produto amplificado. Além disso, esta técnica dispensa os procedimentos pós-PCR, possibilitando a visualização direta dos produtos amplificados e diminuindo o tempo de análise dos resultados. As principais vantagens desta técnica são: a amplificação e a análise do produto no mesmo tubo de reação (tendo desta forma baixo risco de contaminação), protocolos simples e padronização dos resultados pela quantificação de genes (Bustin, 2000).

Um dos principais sistemas de detecção utilizados no PCR em tempo real é o “TaqMan”, que utiliza sondas desenhadas para hibridizar

especificamente com uma região interna do produto de PCR a ser formado. A sonda possui moléculas fluorescentes que emitem um sinal de fluorescência, quando a polimerase replica a região alvo, conforme **figura 2**. A fluorescência aumenta a cada ciclo da reação de PCR (Parashar et al., 2006).

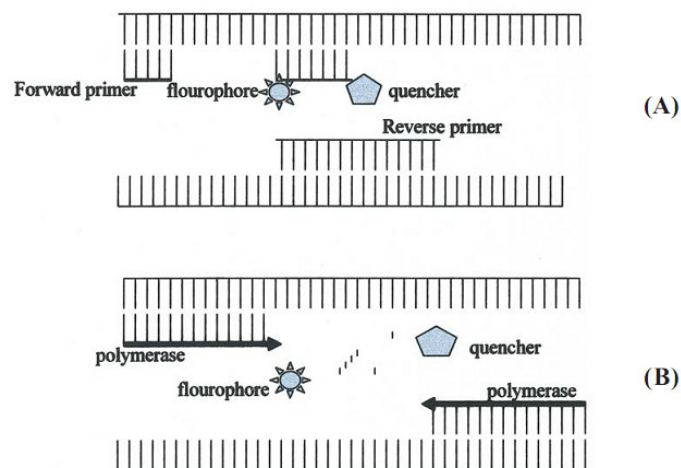


Figura 2 A) A sonda contém um fluoróforo na posição 5' e um *quencher* na posição 3'. A proximidade entre o fluoróforo e o *quencher* ocasiona um substrato não fluorescente. B) A Taq polimerase hidrolisa a sonda e o fluoróforo é separado do “quencher”, resultando em um aumento na emissão da fluorescência (Parashar et al., 2006).

O R-T PCR apresenta dois procedimentos de quantificação padrão: relativa e absoluta. A quantificação relativa compara a expressão de um ou mais genes de interesse em relação a um controle (calibrador). A quantificação absoluta requer um padrão apropriado de uma concentração conhecida para fazer diluições seriadas e estabelecer uma curva padrão. Esta fornecerá uma relação linear entre valores do ciclo limiar (cycle threshold, Ct) e as quantidades iniciais do gene molde, permitindo desta forma determinar a concentração exata das amostras desconhecidas. O Ct é o ponto de detecção

do ciclo na qual a reação atinge um limiar fixo da fase exponencial, permitindo a quantificação exata e reprodutível com base na fluorescência (Bustin, 2000).

1.9 Viabilidade Celular

Após a morte celular, o DNA pode permanecer íntegro por até 3 semanas; assim, métodos de diagnóstico baseados na quantificação do DNA tendem a estimar valores maiores de microrganismos viáveis do que realmente há nas amostras. Métodos de detecção baseados no DNA não conseguem diferenciar se o sinal positivo gerado é originário de uma célula viva ou morta (Nocker et al., 2006). Trabalhos recentes têm utilizando os corantes intercalante de DNA, Brometo de Etídio Monoazídico (EMA) e Propídio Monoazídico (PMA), acoplado à técnica de PCR em tempo real com grande êxito na determinação e quantificação de microrganismos viáveis, visto que eles impedem a amplificação do DNA de células mortas (Nocker et al., 2006; Lee & Levin, 2009). O mecanismo de ação de ambos intercalantes envolve a penetração seletiva do corante nas células danificadas (**figura 3**), por estas apresentarem a membrana celular comprometida. A ativação dos intercalantes de DNA após a sua exposição à luz promove a formação de nitreno, deixando o EMA e o PMA ligados covalentemente ao DNA, comprometendo a solubilidade deste e impedindo a sua amplificação genética por meio de PCR. O DNA de células viáveis possui a membrana intacta, não sendo afetado pela ação dos corantes; assim, sua amplificação ocorre normalmente (Nocker & Camper, 2006; Nocker et al., 2006).

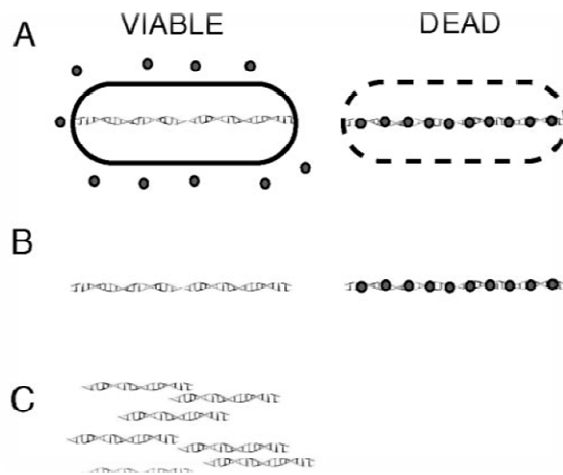


Figura 3 Representação esquemática da PCR após o uso do intercalante de DNA. (A) EMA e PMA são adicionados em uma amostra contendo tanto células viáveis quanto células mortas. EMA e PMA penetram nas células mortas e se ligam no DNA. A exposição à luz por 1 min leva a ligação covalente e inativação dos intercalantes livres. Os intercalantes não penetram nas células viáveis. (B) Existem duas populações de DNA purificado. O DNA da população de células viáveis está puro, enquanto o DNA das células mortas está covalentemente ligado aos intercalantes. (C) O DNA puro das células viáveis é amplificado por PCR, enquanto o DNA das células mortas ligado ao intercalante não pode ser amplificado.

1.10 Justificativa

A demora excessiva no diagnóstico, a identificação incorreta da doença e a ineficácia relativa do tratamento da tuberculose permanecem uma falha nas estratégias de controle da doença e têm sido o foco de muita pesquisa. Tais fatos são críticos se indivíduos infectados permanecem não tratados na comunidade, fornecendo mais probabilidade para transmissão da doença e aumentando os riscos de epidemia. Desta forma, novas ferramentas diagnósticas, com alta sensibilidade para uma identificação rápida da tuberculose, são altamente necessárias.

Os sistemas de tecnologia automatizada, como o PCR em tempo real associado à fluorescência, apresentam maior sensibilidade, especificidade e rapidez no diagnóstico, assim como melhor rendimento no isolamento e identificação do gene alvo. No presente projeto, é apresentada uma proposta de implementação de um teste de diagnóstico molecular para a tuberculose bem como, o rastreamento e otimização de genes identificadores. Da mesma forma, buscou-se a validação, para o *M. tuberculosis* de uma abordagem seletiva de detecção de DNA de células viáveis.

1.11 Objetivos

1.11.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é identificar e quantificar, pela metodologia do PCR em tempo real, o DNA do bacilo viável do *Mycobacterium tuberculosis*, a partir de amostras de cultura e escarro de pacientes submetidos à investigação de tuberculose.

1.11.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Comparar o Sistema PCR em tempo real em relação aos métodos de rotina no diagnóstico da tuberculose;

2.2.2 Implementar teste para diagnóstico molecular da tuberculose a partir da seleção de gene identificador para quantificação do *Mycobacterium tuberculosis*.

Capítulo 2

Optimization of Intercalating dye-based discrimination of viable *Mycobacterium tuberculosis* in Real-Time PCR absolute quantification of DNA from sputum

Artigo submetido ao *Journal of Clinical Microbiology*,
publicado pela *American Society of Microbiology* - ASM
Fator de Impacto: 4.16

Optimization of Intercalating dye-based discrimination of viable *Mycobacterium tuberculosis* in Real-Time PCR absolute quantification of DNA from smear negative and smear positive sputum.

Running Title: Absolute quantification of *M. tuberculosis*

Thiago Milech de Assunção^{1,2,3}, Candida Deves^{1,2,4}, Valnês da Silva Rodrigues-Junior^{1,2,4}, Ana Cristina de Oliveira Dias^{1,2}, Gisela Unis⁶, Vânia Faria Marques da Rocha⁶, Pedro Dornelles Picon⁶, Luiz Augusto Basso^{1,2,3,4}, Diógenes Santiago Santos^{1,2,3,4*}, Eraldo L. Batista Jr.^{1,2,3,5*}

¹ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, ² Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, ³ Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, ⁴ Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, ⁵ Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil and ⁶Hospital Sanatório Partenon, Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente, Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brazil.

Adress Correspondence to: Eraldo L. Batista Jr. or Diógenes Santiago Santos, Avenida Ipiranga 6900 Prédio 92^a – TECNOPUC. 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Phone/Fax: +55 51 3320 3629. E-mail: eraldo.junior@pucri.br, diogenes@pucri.br

Abstract

Diagnostic methods of TB, nowadays, are prone to delay in diagnosis, increased false negative results and are not sensitive to many forms of paucibacillary disease. Infected individuals remain untreated in the community, increasing the likelihood of disease transmission and epidemic aggravation, which urges the need of new diagnostic methods. The aims of this study were to implement a quantitative nucleic acid-based diagnostic test for paucibacillary tuberculosis, enabling the identification and quantification of viable *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*) bacilli by fluorescence-assisted PCR, i.e., Real-Time PCR (R-T PCR). The intergenic region of the single-copy *inhA-mabA* gene was chosen as the target region for design of primers and probes conjugated with fluorophores. The construction of synthetic DNA flanking the target region served as standards for absolute quantification of nucleic acids. Cultures of *M. tuberculosis* H37Rv were treated with different concentrations of EMA and PMA, DNA intercalating dyes that bind to the DNA of dead cells, rendering it insoluble, thus hampering its isolation. The concentration of 100 μ M PMA was chosen to treat sputum samples from patients with TB. The diagnosis method showed a broad sensitivity (96.1%) when compared to samples of smear-positive sputum and it showed to be 45% more sensitive than Ziehl-Neelsen staining for smear-negative samples. It is noteworthy that from the 72 samples diagnosed as negative by BAAR, 33 (45.18%) were R-T PCR positive for *Mycobacterium*, while 39 (54.16%) are negative for both. Likewise, from the 26 BAAR-positive samples, 22 (88%) were also R-T PCR positive with DNA from viable *Mycobacterium*, while 3 (12%) were detected as non-viable.

Keywords: diagnosis; tuberculosis; real time PCR; cell viability, smear; EMA; PMA.

Introduction

Mycobacterium tuberculosis infection remains a serious public health problem due to its high risk of person-to-person transmission and its high rates of morbidity and mortality (30). Sputum smear microscopy is currently the most widely used method for diagnosis of pulmonary tuberculosis (TB) in developing countries. Nevertheless, the Ziehl-Neelsen staining has a sensitivity of only 50-60%, partly because a positive smear needs a large quantity of acid-fast bacilli (AFB) per μl sputum (27). This is a significant problem that eventually leads to false negative results, thus leaving infected individuals without treatment, increasing the likelihood of disease transmission and epidemic aggravation. Therefore, the rapid detection and identification of *M. tuberculosis* in secretions would be highly desirable for proper diagnosis and effective treatment, along with the prevention and control of tuberculosis transmission. Real-time Polymerase Chain Reaction (R-T PCR) has become an invaluable tool for detection of Mycobacterial infection (3, 13). This approach, using specific primers and detection probes, offers many advantages such as higher sensitivity, specificity and faster diagnosis of *Mycobacterium* infection.

The distinction between viable and dead bacterial cells poses a major challenge in PCR diagnostics. Due to the persistence of DNA in the environment after cells have lost viability, DNA-based quantification methods overestimate the number of viable cells in mixed populations or lead to false positive results in the absence of viable cells (7, 16, 17). This is particularly relevant for pathogens subjected to killing treatments such as antibiotics (23, 24). The use of DNA-intercalating dyes such as ethidium bromide monoazide (EMA) and propidium monoazide (PMA) for assessment of bacterial viability has been used for this purpose (7, 9, 17, 23, 28). These fluorescent dyes penetrate into “dead” cells, i.e., cells with compromised membranes, and the subsequent photoinduced cross-linking is reported to inhibit PCR amplification of DNA from since it is rendered insoluble (16).

The aim of the present study was to implement a quantitative nucleic acid-based diagnostic test for tuberculosis, thus enabling the identification and quantification of viable *M. tuberculosis* bacilli by fluorescence-assisted PCR amplification directly from sputum.

Materials and Methods

Culture of *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis H37Rv maintained in Ogawa medium was subcultured in 10 ml of Middlebrook 7H9 (Difco) liquid medium containing 10% (v/v) OADC enrichment (oleic acid, albumin, dextrose, catalase; Becton Dickinson) and 0.05% (w/v) Tween 80 (Sigma) in a 50 ml tube. Cultures were incubated at 37 °C for 3 weeks to an optical density of 0.4-0.5 at 580 nm absorbance. The spectrophotometric measurements were carried out in disposable plastic cuvettes in a total volume of 1 ml and the conversion factor used was of 0.4 $OD_{580} = 2.5 \times 10^8$ cells. An aliquot of 6 ml of liquid culture was vortexed with glass beads (4 mm) and centrifuged at 8000 x g for 15 min, then 6 ml of phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.5 was added to the bacterial pellets to prepare the live suspensions of *M. tuberculosis*. For heat-killing (HK), five-hundred microliter aliquots containing approximately 1.25×10^8 cells of cultured *M. tuberculosis* were heat inactivated by incubation at 90 °C for 25 min using a standard laboratory heat block. Samples were immediately transferred to ice after treatment before DNA isolation.

Optimization of EMA and PMA concentrations

Ethidium monoazide bromide (EMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) was dissolved in water to a stock concentration of 5mg/ml whereas one milligram of Propidium monoazide (PMA) (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) was dissolved in 1.96 ml of 20% DMSO to obtain a stock solution of 1 mM. Both solutions were aliquoted and stored in the dark at -20 °C. EMA or PMA was added to 500 µL aliquots of heat-killed and live *M.*

tuberculosis cells to a final concentration of 10, 50, 100 µg/ml and 10, 50, 100µM respectively. Samples were incubated in the dark for 5 or 10 min with occasional flipping to allow diffusion of the intercalating dyes into dead cells. Light exposure was performed for 1, 2 or 5 min using a 650-W halogen light source (Sylvania,, São Paulo, SP, Brazil) placed at a distance of 20 cm from the samples laid horizontally in triplicates, on ice to avoid excessive heating. Control samples comprised 500 µL (1.25×10^8 cells) of viable and heat-killed cells non-treated with EMA or PMA. After photo induced cross-linking, cells were pelleted at 8000 x g for 5 min prior to DNA isolation from the pellet.

N-acetyl-L-cysteine (NALC) treatment

Samples of *M. tuberculosis* were split into two 1 ml aliquots; the first received 25% of the initial volume of 50mg/ml NALC (Sigma-Aldrich) diluted in a solution of sodium citrate final concentration of 1% and the second received 25% of phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.5; both were homogenized in a vortex stirrer. The samples were incubated at room temperature for 20 min and after the incubation, the mixture was neutralized with PBS, bringing the total volume to 2 ml. After this step, 500 µL of each sample was heat-killed, centrifuged at 8.000 x g for 4 min; afterwards, the cell pellet was washed with PBS (1 ml) and centrifuged at 8.000 x g for 4 min; the latter procedure was repeated three times to neutralize and remove any traces of NALC. All aliquots were treated with 100 µM of intercalating dye.

DNA isolation

DNA was isolated using a commercial kit (Dneasy, Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions with slight modifications. Lysozyme at 30 mg/ml in lysis buffer was added and incubated with the cells extract for 2 hours at 37°C. After successive washes, the DNA retained on the column membrane was eluted with 100 µl of

buffer. DNA concentration was estimated by spectrophotometry (Ultrospec 3100 Pro, Amersham Bioscience) at 260 and 280 nm.

Design and Synthesis of primers and probes for TaqMan Assay

The intergenic region of *inhA-mabA* was selected as target sequence based on its specificity and the absence of homology relative to other eukaryotic and prokaryotic sequences currently available in databases. Design of primers and probe according to optimum standard cycling conditions was carried out based on pre-established conditions for TaqMan chemistry, i.e., denaturing temperature at 95°C and annealing/extension at 60°C. The designed sequences (Figure 1) were then submitted to a primer/probe synthesis service (Custom-Assays, Applied Biosystems, Foster, CA, USA). The primers (F5'- tgggccactgacacaacac -3', R5'- cgctaaccagaatccgtttgc -3') were synthesized so as to flank a 70-bp region of the *inhA-mabA* intergenic region. A FAM-labeled probe (5'- cctgtcatgtgcgtcctt -3') was also synthesized so as to anneal in between. Sequence detection was carried out in a thermalcycler (ABI 7500, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) using a 50-cycle, 2-step PCR protocol (95°C-40 s/60°C-60 s). The amplification mix also contained appropriate concentrations of buffer, dNTPs, MgCl₂, recombinant Taq DNA polymerase and ROX internal normalization control (TaqMan Master Mix, Applied Biosystems, Foster, CA, USA).

Synthesis of standards for absolute quantification

The standards for absolute quantification were obtained by direct amplification of *M. tuberculosis* genomic DNA, targeting the intergenic region described above. Therefore, primers were designed so as to flank the recognition sequence covered by the primers and TaqMan probe to *inhA-mabA*, adding some 61 bases upstream and 60 bases downstream (total amplicon size=190 bp) to the real-time detection amplicon (Figure 1). The primers (F-5'-gcttccgaggatgagctatatctccgg-3', R-5'-cgccctgctcctgggctaccgt-3') were used in a final

concentration of 300 nM in the 50- μ l amplification reaction mix containing 10 mM of dNTPs, 2 mM of MgCl₂, 2 units of Taq DNA polymerase blend (Platinum High Fidelity®, Invitrogen, Carlsbad CA, USA), buffer and 500 ng of *M. tuberculosis* genomic DNA. The reaction was kept at 94°C for 10 minutes and then by 28 cycles of 94°C (30 s), 59°C (30 s), and 68°C (45 s), followed by a final step of 68°C for 15 minutes. The amplification products were separated by electrophoresis in 1% agarose gels, stained with ethidium bromide, and inspected in an UV transilluminator to check for amplicon size (190 pb). The corresponding bands was isolated from agarose gels and purified. To synthesize the standards, the amplified sequences were cloned into T-A vectors (RBC, Banqiao City, Taiwan); nearly 100 ng of the purified *inhA-mabA* amplicon was incubated with 25 ng of the vector and two units of T4 DNA ligase, ATP and buffer for 12 hours at 15°C. The recombinant vectors were used to transform DH10B *E. coli* cells through electroporation and propagated in LB agar plates containing ampicillin (50 μ g/ml) for 12 hours at 37°C. The colonies grown overnight were propagated in LB medium containing ampicillin (50 μ g/ml) for 12 hours at 37°C with constant shaking. The culture (5 ml) was then centrifuged and the pellet lysed for plasmid purification. Plasmid DNA concentration was determined by fluorimetry (QuBit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the absolute numbers of plasmid molecules calculated as previously reported (32). Serial dilution of plasmids was set from 10⁶ to 10¹ cells , aliquoted and stored at -80°C .

Study Subjects

Clinical samples were obtained from 98 consecutively admitted subjects with suspected pulmonary tuberculosis at the Hospital Sanatorio Partenon (Porto Alegre, RS, Brazil) from May to August of 2010. The study was previously approved by the Ethics Committee of the Public Health School under Protocol #568/10. A written informed consent was obtained from all study subjects before admission. Once collected, the samples were sent

for clinical analysis, where acid-fast bacilli detection using the direct technique of Ziehl-Neelsen staining was carried out. The interpretation of acid-fast bacilli (AFB) microscopy results were in accordance to the current International Union Against Tuberculosis and Lung Disease guidelines (1). The results were reported according to the following scale: “0” for absence of AFB per field in 100 observed fields, “1 to 9” AFB (the exact number of AFB per 100 fields for *scanty* positive), “+” presence of 10-99 AFB per 100 fields, “++” presence of 1-10 AFB per field on at least 50 fields, or “+++” presence of ≥ 10 AFB per field on at least 20 fields.

Additional processing of sputum for Molecular assays was performed in a level 3 Biological Safety laboratory at the Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional do Instituto de Ciência e Tecnologia em Tuberculose of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS, Brazil. The samples were refrigerated at 4°C for transportation to the laboratory and stored at -20°C until processing.

Sputum samples processing

Solubilization of 1-ml sputum samples were carried out for 30 min at room temperature by adding 25% of the initial volume of 50 mg/ml NALC. Samples were then vortexed and mixed with another 750 μ l of PBS pH 7.5 to a final volume of 2 ml. After this step, the sample was centrifuged at 8.000 x g for 4 min and the pellet was washed with 1 ml of PBS pH 7.5, and centrifuged at 8.000 x g for 4 min; the latter procedure was repeated three times to neutralize and remove traces of NALC. After the last washing, the pellet was resuspended in 500 μ l of PBS pH 7.5. One 250 μ l-aliquot received treatment with 100 μ M of intercalating dye and the other received no further treatment (control). The DNA was extracted and quantified as described above.

Results

EMA and PMA treatment

Live and heat killed *M. tuberculosis* were exposed to different EMA and PMA concentrations; for comparison purposes the live control samples that did not receive the intercalating dye were set as 100% viable cells. Likewise, heat killed cells non-treated with the dye were set as 100% dead cells as previously reported (4). EMA treatment at all three concentrations did lead to lower numbers of cells of the heat inactivated group. In this experiment, EMA at 50 and 100 μ g/mL gave the best results. On the other hand, the increased concentration of the EMA dye (10, 50 and 100 μ g/mL) also markedly affected the amplification of live cells (76%, 60% and 21%, respectively) when compared with the sample that did not receive the dye (Figure 2). In contrast, live cells treated with different concentrations of PMA showed no significant difference ($P>0.05$) in absolute numbers (92%, 97% and 91%) relative to non-dye treated cells. The effect of PMA in the dead cells increased with higher PMA concentrations. The concentration of 100 μ M PMA was shown to be the optimal concentration to inhibit the amplification of dead cells. Since our data as well as others indicated that EMA inhibits the amplification of live cells (17), the subsequent experiments were conducted with PMA only.

Optimization of PMA conditions

The next step was to verify the different times of culture sample exposure to 100 μ M of PMA. Incubation for 5 and 10 min was carried on ice and protected from light, with eventual spins. The extended time of 10 min of incubation results in no significant difference ($P>0.05$) when compared to 5 min (Figure 3A), so the incubation time of 5 min was chosen as a protocol.

Further, different exposure times to the halogen lamp were evaluated. Samples incubated for 5 minutes with 100 μ M PMA were exposed for 1, 2 and 5 min to a 650W

halogen lamp. Exposure to the light for 5 min was excluded because of excessive heating of the samples and eventual melting of the microtube polypropylene. Exposures of 1 and 2 min were included in the analysis (Figure 3B). No significant differences were observed when comparing the two exposure times to halogen lamp, but there was a decrease in the absolute numbers of *M. tuberculosis* in the group exposed for 2 min (not shown), which may have occurred due to excessive heating. Therefore, as a protocol, experiments were performed by incubating the sample with 100 μ M PMA for 5 min, in ice, protected from light, followed by a one-minute sample exposure to the halogen lamp.

NALC x PMA

We checked whether the addition of NALC could have a negative effect on PMA activity. A culture of *M. tuberculosis* was divided in two aliquots: the first received 50% of the initial volume of NALC and the other aliquot received 50% of PBS pH 7.5 (control). The cultures were then treated with 100 μ M PMA for 5' and exposed to halogen light. The DNA was extracted and a decrease in the number of *M. tuberculosis* was noted in the samples treated with NALC (data not show). Thus, the experiment was further repeated by incubating the samples with 25% of the initial volume of NALC and PBS; before of the treatment with PMA the pellet was washed three times with PBS pH 7.5, to remove traces of NALC. At this concentration NALC did not affect cell viability and PMA treatment (Figure 4). Therefore, NALC was added to 25% of the initial volume of sputum without affecting the viability of *M. tuberculosis*.

Comparison between Ziehl-Neelsen staining and Real-time PCR

Beginning in May of 2010 throughout August of 2010, 98 patients of the Hospital Sanatorio Partenon with suspected tuberculosis or on anti-tuberculosis treatment were interviewed and had a sputum sample collected. The majority of the patients were men (68%);

the mean age at evaluation was 38.71 ± 14 years (range 17-88 years). Ziehl-Neelsen staining was performed and identified 26 patients with smear-positive tuberculosis and 72 with smear-negative tuberculosis. Demographic data is shown in Table 1.

As shown in Figure 5, diagnosis based on bacilloscopy and R-T PCR revealed a positive association, which was more evident in the absence of PMA, i.e., non-selective quantification of viable *M. tuberculosis* (Spearman $\rho=0.60$, $p<0.01$). Pre-incubation of sputum with PMA also revealed a positive association (Spearman $\rho=0.54$, $P<0.01$), although some R-T PCR results were slightly above the 25th percentile for both analysis in + samples. Importantly, most R-T PCR quantitative results fitted a range within each bacilloscopy classification. As depicted by Figure 6, our PCR detection approach for *Mycobacterium* was positive in 25 out of the 26 smear-positive samples (sensitivity of 96.1%) and in 33 out of 72 smear-negative samples (sensitivity of 45.18%). Each sample was divided in two groups; one received the treatment with PMA and the other did not receive any treatment with dye. The strategy aimed at comparing the results of the Ziehl-Neelsen staining (0, +, ++ and +++ classification) as previously described, with the total number of *M. tuberculosis* detected by R-T PCR, as well as the amount of viable cells. The total number of *M. tuberculosis* ranged proportionally; the greater the positivity of the bacilloscopy, the higher was the number of the pathogens detected by R-T PCR. A total of 59 samples not treated with PMA were detected by R-T PCR; of these, 42 presented amplification of the target gene after the dye treatment. The 16 samples not detected after the use of PMA were from patients who had started treatment anti-TB. It is noteworthy that from the 72 samples diagnosed as negative by BAAR, 20 (60.6%) were R-T PCR positive for *Mycobacterium*, while 39 (54.18%) are negative for both methods. Likewise, from the 25 BAAR-positive samples, 22 (88%) were also R-T PCR positive with DNA from viable *Mycobacterium*, while 3 (12%) were detected as non-viable.

Discussion

Tuberculosis has become, again, a real public health concern even in developed countries. Noteworthy, the appearance of *M. tuberculosis* strains that are resistant to standard antimicrobial protocols added increased awareness of the disease. Therefore, early detection of individuals contaminated with *M. tuberculosis* has also become a key strategy in the control of disease spread. The delay in diagnosis, the incorrect identification of the infection and the relative inefficacy of tuberculosis treatment cause failure of disease control strategies. Effective interventions are necessary to prevent infected individuals from being left untreated in the community, leading to a higher probability of disease transmission and increasing the risks of epidemic (33). Rapid detection of active TB infection is critical for prompt therapy initiation and implementation of infection control measures. In the present study we propose the development and validation of a fast and sensitive system for detection and quantification of clinical samples potentially infected with viable *M. tuberculosis*.

Molecular tools for diagnosis offer a number of advantages, however, most of the research data on molecular detection of *M. tuberculosis* rely on its identification (13), differentiation of *Mycobacterium* species (10, 19) and mutations that confer drug resistance (12, 14, 22). There is limited studies reporting *M. tuberculosis* counts found in biological samples and those that do report it, mostly use regions of multiple copies in the genome as a molecular target, thus hampering determination of absolute number of the pathogen (5, 29). Noteworthy, to our knowledge, this is the first investigation that contemplated both, estimation of absolute numbers of *Mycobacterium* cells using a molecular tool and discrimination of live/dead cells with an intercalating dye. In our study, the total number of *M. tuberculosis* from culture or sputum samples was determined by the amplification of the *inhA-mabA* intergenic region, a single copy gene of *M. tuberculosis*, thus providing a more accurate number *M. tuberculosis* cells per sample volume. The choice of the *inhA-mabA* region for

primers/probe synthesis relied on the fact that this is a very specific sequence, as well as the importance that this gene has on *M. tuberculosis* biology. *M. tuberculosis* genomic DNA served as a template for amplification of the region flanking the target sequence and, after cloning and transformation of *E. coli* cells, the plasmid units were used as standards; the concentration of this DNA was determined and subsequently the plasmid number was calculated. The increase in fluorescence of DNA standards was monitored and used to generate a regression equation and a standard curve, allowing calculation of unknown samples, such as described previously in oral samples (11, 25).

Mutations of the *inhA* structural gene and the *inhA* promoter region have been identified in *M. tuberculosis* isoniazid-resistant strains (2, 21, 26). These mutations are associated with isoniazid resistance *in vivo* due to a reduced affinity for the cofactor NADH, suggesting that the mechanism of drug resistance may be related to specific interactions between enzyme and cofactor within the NADH binding site (26). The regions covered by the primers and probes of the primers/probe set used did not anneal to putatively mutated regions known thus far. Therefore, according to the strategy used herein and the current knowledge of *M. tuberculosis* genetics, no discrimination between strains could be made in this phase of the study.

DNA-based detection systems using PCR may give rise to false positives since some native template DNA amplified can originate from dead cells. Rather than just detecting *M. tuberculosis*, it is important to differentiate DNA from dead and live cells. This is particularly true if the approach described herein is to be used for evaluation of therapy efficacy. Previous publications showed the successful use of EMA and PMA, two DNA intercalating dyes to differentiate live from dead bacterial cells (9, 15, 17). Both are capable of penetrating dead cells with compromised membrane, rendering DNA of dead cells insoluble, thus abrogating amplification (17, 18). Our results showed that viable or heat-killed culture samples without PMA or EMA treatment had the same number of *M. tuberculosis* cells, and the increase in

concentration of the two dyes resulted in proportional decrease of the amplification of the heat-killed cells, with no effects over amplification efficiency. However, our results suggest that EMA could penetrate to a certain extent into viable cells, a finding also reported by others (4, 17, 20). This explains the reduction in the total number of viable *M. tuberculosis* after EMA treatment, which increased with higher concentrations of the dye. There were significant differences among the three concentrations of PMA used when compared to the group that received no dye addition. Pholwat et al. recently showed that the concentration of 50 and 100 μM PMA completely inhibited PCR amplification of 7.5×10^4 dead cells from cultures. They have also found that the concentration of 100 μM PMA seems to affect the amplification of living cells (20). Our results showed that 100 μM PMA was the optimal concentration to suppress the amplification of dead cells, with no effect on live cells. This difference in the effect of PMA concentrations are likely due to the larger number of cultured *M. tuberculosis* cells used in our study, i.e., 1.25×10^8 cells. Also noteworthy, since we worked with direct processing of sputum as well, the higher PMA concentration was adequate so as to overcome sputum viscosity, addition of NALC, a reduced number of *M. tuberculosis* cells per volume unit and the complexity of the secretion itself, which also carries host cells and bacteria from other sources, such as the mouth. After choosing the optimal concentration of PMA and excluding EMA of the experiments, it became clear that increasing the incubation time with the dye and exposure time to the halogen lamp from 5 min to 10 min and from 1 min to 2 min respectively, caused no significant difference in amplification. Therefore, shorter timer intervals were chosen.

Sputum specimens are usually digested and decontaminated by the NALC-NaOH method was previously described (8), but other groups have shown that the decontamination with sodium hydroxide kills many viable tuberculosis bacilli (6, 31). The *M. tuberculosis* DNA from samples treated and killed with sodium hydroxide may still be detected by PCR (31), but as one of the proposals of this study was to verify the viability of the bacilli, we

chose not work with NaOH. Thus, it was demonstrated that culture samples treated with 25% of the initial volume of NALC followed by washes with PBS to remove its traces did not affect the viability of the bacilli or PMA action.

The smear test with Ziehl-Neelsen staining remains the most widely used technique for TB diagnosis. Our approach to *M. tuberculosis* DNA detection showed a higher sensitivity (96.1%) compared to the smear positive samples, consistent with results of previous studies that evaluated nucleic acid amplification, but no quantification (29). It was possible to detect DNA of viable *Mycobacterium* on 33 out of 72 smear-negative samples. As a matter of fact, there has been a significant variation in the absolute numbers of cells identified by R-T PCR when compared with Ziehl-Neelsen grading results, but mean total numbers ranged proportionally among the 2 tests and a significant correlation was shown. It is important to emphasize that the smear test can be prone to variations as it represents a visual counting of the bacilli in selected fields, and no viability can be ascertained. Noteworthy, detection of viable cells through PMA resulted in a significant decrease in the absolute numbers of cells compared with the same samples without PMA treatment. This was more pronounced in samples from patients on anti-tuberculosis treatment. Others had already shown a gradual decrease in the number of colony forming unit with the initial use of anti-tuberculosis agents (5).

Diagnosis of TB is as crucial as its treatment, and the implementation of novel strategies that aid in the rapid and precise detection of Mycobacterial infection is the cornerstone of disease control. Here we showed an effective and rapid quantitative molecular approach to detection of *Mycobacterium* sp., substantiated by selective discrimination of viable cells from sputum samples. Further studies focusing on detection and quantification of *Mycobacterium* sp. resistant strains are also warranted.

Acknowledgments

We thank to the tuberculosis working group at Hospital Sanatorio Partenon. This research has been supported by CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development) and National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (INCT-TB).

References

1. Ait-Khaled, N., Alarcon, E., Bissel, K., Boillot, F., Caminero, J., Chen-Yuan, C., Clevenbergh, P., Dlodlo, R., Enatrson, D., and Enarson, P. (2010). Caring for the Patients. In Management of tuberculosis A guide to the essentials of good practice Saint-Michel, France.
2. Basso, L.A., Zheng, R., Musser, J.M., Jacobs, W.R., Jr., and Blanchard, J.S. (1998). Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. *J Infect Dis* 178, 769-775.
3. Broccolo, F., Scarpellini, P., Locatelli, G., Zingale, A., Brambilla, A.M., Cichero, P., Sechi, L.A., Lazzarin, A., Lusso, P., and Malnati, M.S. (2003). Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* load by two real-time calibrated PCR assays. *J Clin Microbiol* 41, 4565-4572.
4. Cawthorn, D.M., and Witthuhn, R.C. (2008). Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *J Appl Microbiol* 105, 1178-1185.
5. Desjardin, L.E., Chen, Y., Perkins, M.D., Teixeira, L., Cave, M.D., and Eisenach, K.D. (1998). Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 36, 1964-1968.
6. Grandjean, L., Martin, L., Gilman, R.H., Valencia, T., Herrera, B., Quino, W., Ramos, E., Rivero, M., Montoya, R., Escombe, A.R., *et al.* (2008). Tuberculosis diagnosis and multidrug resistance testing by direct sputum culture in selective broth without decontamination or centrifugation. *J Clin Microbiol* 46, 2339-2344.
7. Josefsen, M.H., Lofstrom, C., Hansen, T.B., Christensen, L.S., Olsen, J.E., and Hoorfar, J. (2010). Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Appl Environ Microbiol* 76, 5097-5104.
8. Kent, P., and Kubica, G. (1985). Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory, Atlanta, GA, Department of Health and Human Services, Public Health Service, Center for Disease Control Prevention.
9. Kralik, P., Nocker, A., and Pavlik, I. (2010). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. *Int J Food Microbiol* 141 Suppl 1, S80-86.
10. Kraus, G., Cleary, T., Miller, N., Seivright, R., Young, A.K., Spruill, G., and Hnatyszyn, H.J. (2001). Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR. *Mol Cell Probes* 15, 375-383.
11. Lyons, S.R., Griffen, A.L., and Leys, E.J. (2000). Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol* 38, 2362-2365.
12. Massire, C., Agasino Ivy, C., Lovari, R., Kurepina, N., Li, H., Blyn, L.B., Hofstadler, S.A., Khechinashvili, G., Stratton, C.W., Sampath, R., *et al.* (2010). Simultaneous

mycobacterial speciation and determination of tuberculosis drug resistance by PCR/ESI-MS. *J Clin Microbiol* [Epub ahead of print].

13. Min, J.W., Yoon, H.I., Park, K.U., Song, J.H., Lee, C.T., and Lee, J.H. (2010). Real-time polymerase chain reaction in bronchial aspirate for rapid detection of sputum smear-negative tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* *14*, 852-858.

14. Moure, R., Munoz, L., Torres, M., Santin, M., Martin, R., and Alcaide, F. (2010). Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and Rifampin Resistance in Smear-negative Clinical Samples using an Integrated Real Time PCR Method. *J Clin Microbiol* [Epub ahead of print].

15. Nocker, A., and Camper, A.K. (2006). Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl Environ Microbiol* *72*, 1997-2004.

16. Nocker, A., and Camper, A.K. (2009). Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiol Lett* *291*, 137-142.

17. Nocker, A., Cheung, C.Y., and Camper, A.K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* *67*, 310-320.

18. Nocker, A., Mazza, A., Masson, L., Camper, A.K., and Brousseau, R. (2009). Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *J Microbiol Methods* *76*, 253-261.

19. Pao, C.C., Yen, T.S., You, J.B., Maa, J.S., Fiss, E.H., and Chang, C.H. (1990). Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol* *28*, 1877-1880.

20. Pholwat S, Heysell S, Stroup S, Foongladda S, Houpt E. (2011). Rapid first- and second-line drug susceptibility assay for *Mycobacterium tuberculosis* isolates by use of quantitative PCR. *J Clin Microbiol* *49*(1):69-75.

21. Quemard, A., Sacchettini, J.C., Dessen, A., Vilcheze, C., Bittman, R., Jacobs, W.R., Jr., and Blanchard, J.S. (1995). Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* *34*, 8235-8241.

22. Ramirez, M.V., Cowart, K.C., Campbell, P.J., Morlock, G.P., Sikes, D., Winchell, J.M., and Posey, J.E. (2010). Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol* *48*, 4003-4009.

23. Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S.M., and Holck, A.L. (2005a). Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl Environ Microbiol* *71*, 1018-1024.

24. Rudi, K., Naterstad, K., Dromtorp, S.M., and Holo, H. (2005b). Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* *40*, 301-306.

25. Rupf, S., Merte, K., and Eschrich, K. (1999). Quantification of bacteria in oral samples by competitive polymerase chain reaction. *J Dent Res* 78, 850-856.
26. Schroeder, E.K., Basso, L.A., Santos, D.S., and de Souza, O.N. (2005). Molecular dynamics simulation studies of the wild-type, I21V, and I16T mutants of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase (InhA) in complex with NADH: toward the understanding of NADH-InhA different affinities. *Biophys J* 89, 876-884.
27. Siddiqi, K., Lambert, M.L., and Walley, J. (2003). Clinical diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in low-income countries: the current evidence. *Lancet Infect Dis* 3, 288-296.
28. Soejima, T., Iida, K., Qin, T., Taniai, H., Seki, M., and Yoshida, S. (2008). Method To Detect Only Live Bacteria during PCR Amplification. *J Clin Microbiol* 46, 2305-2313.
29. Takakura, S., Tsuchiya, S., Isawa, Y., Yasukawa, K., Hayashi, T., Tomita, M., Suzuki, K., Hasegawa, T., Tagami, T., Kurashima, A., *et al.* (2005). Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by transcription-reverse transcription concerted reaction with an automated system. *J Clin Microbiol* 43, 5435-5439.
30. WHO (2010). Global tuberculosis control: WHO reports 2010. (Geneva, Switzerland).
31. Yajko, D.M., Wagner, C., Tevere, V.J., Kocagoz, T., Hadley, W.K., and Chambers, H.F. (1995). Quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical sputum specimens and dilution endpoint of its detection by the Amplicor PCR assay. *J Clin Microbiol* 33, 1944-1947.
32. Yun, J.J., Heisler, L.E., Hwang, H., Wilkins, O., Lau, S.K., Hycza, M., Jayabalasingham, B., Jin, J., McLaurin, J., Tsao, M.S., *et al.* (2006a). Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 34, e85.
33. Yun, J.S., Lazarus, A.A., and Gilbert, R. (2006b). Latent tuberculous infection. *Dis Mon* 52, 441-445.

TABLE 1. Demographic and Clinical Characteristics of subjects.

Variable	Gender		
	M	F	Total
Gender	68	30	98
Median Age – yr	39.67	36.53	38.71
Smoking	16	6	22
History of tuberculosis	22	10	32
Treatment anti-TB	35	16	51
Ziehl-Neelsen Classification			
Smear -	49	23	72
Smear +	6	6	12
Smear ++	4	1	5
Smear +++	9	0	9

```

...GGGTGGTCAGCTTCCTGGCTTCCGAGGATGCGAGCTATATCTCCGGTGCGGTTCATCCCGGTGACGGCGGCATGG
GTATGGGCCACTGACACAACACAAAGGACGCACATGACAGGACTGCTGGACGGCAAACGGATTCTGGTTAGCGGAATCA
TCACCGACTCGTCGATCGCGTTTACATCGCACGGGTAGCCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGCTCACCGGGT...

```

↓
TaqMan Probe

Figure 1. *inhA-mabA* transgenic region targeted by amplification (Accession # Rv1483). The annealing region of Real-Time primers is underlined, and TaqMan probe annealing region is boxed. Standards for absolute quantification were produced by PCR amplification and cloning of a region that flanked the real-time amplicon (gray).

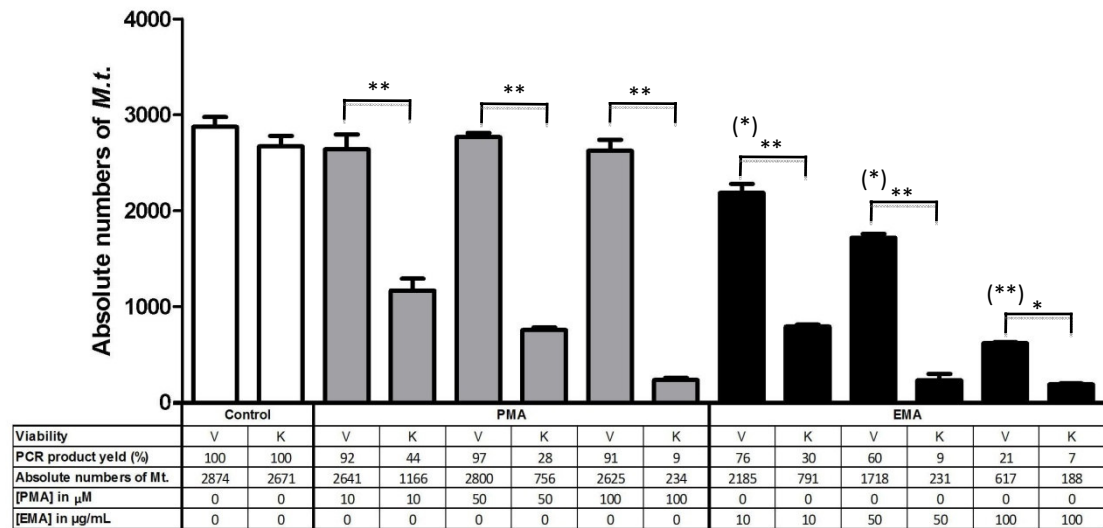


Figure 2. The effect of different concentrations of PMA (gray columns) and EMA (black columns) on viability discrimination after R-T PCR-based counts. The control sample that did not receive PMA or EMA treatment is shown in white; product yield of the control was defined as 100% for viable (V) and heat-killed (K) cells. The concentrations of PMA and EMA are shown below of the graph. Error bars represent standard deviations from three independent cultures of *M. tuberculosis* run in replicates. **P<0.001, *P<0.05. (**) and (*) stand for statistically significant differences relative to controls (white columns).

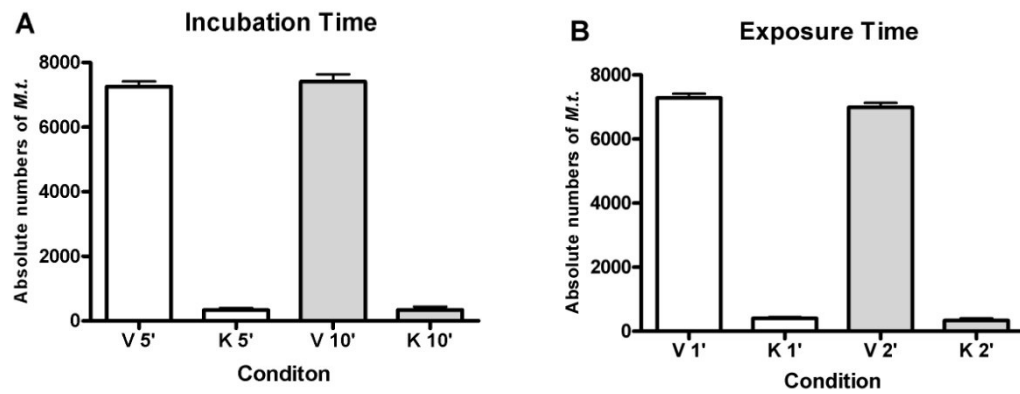


Figure 3. Optimization of 100 μ M PMA treatment. (A) Sample incubation with PMA at different times in the dark. (B) Different times of sample exposure to the halogen lamp. There is no significant difference ($P>0.05$) between 5 or 10 min of dark incubation and between 1 and 2 min of exposure halogen light. Error bars represent standard derivations obtained from three independent physical replicates (DNA isolation). V= viable and K= heat killed.

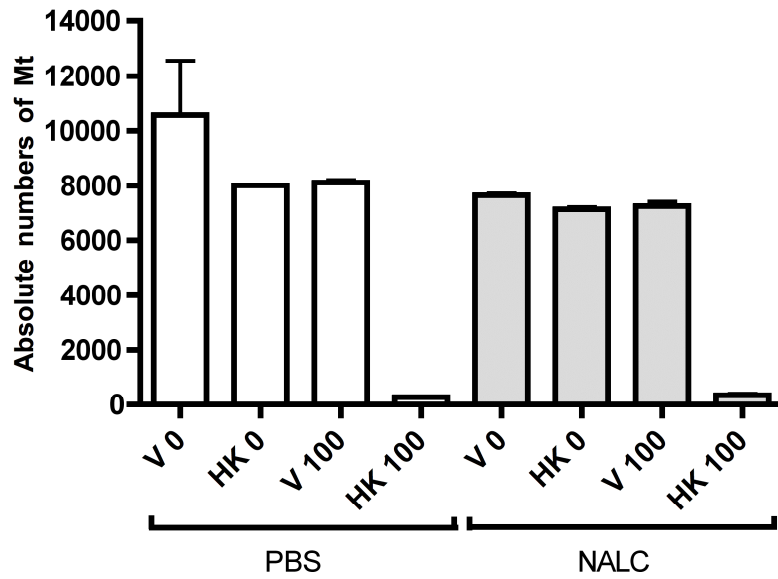


Figure 4. Comparison of the effect of PMA in sputum samples treated with PBS and NALC. There is no significant difference ($P>0.05$) between samples treated with PBS and NALC added at 25% of the initial volume of sputum. Error bars represent standard derivations obtained from three independent replicates. V= viable and HK= heat killed.

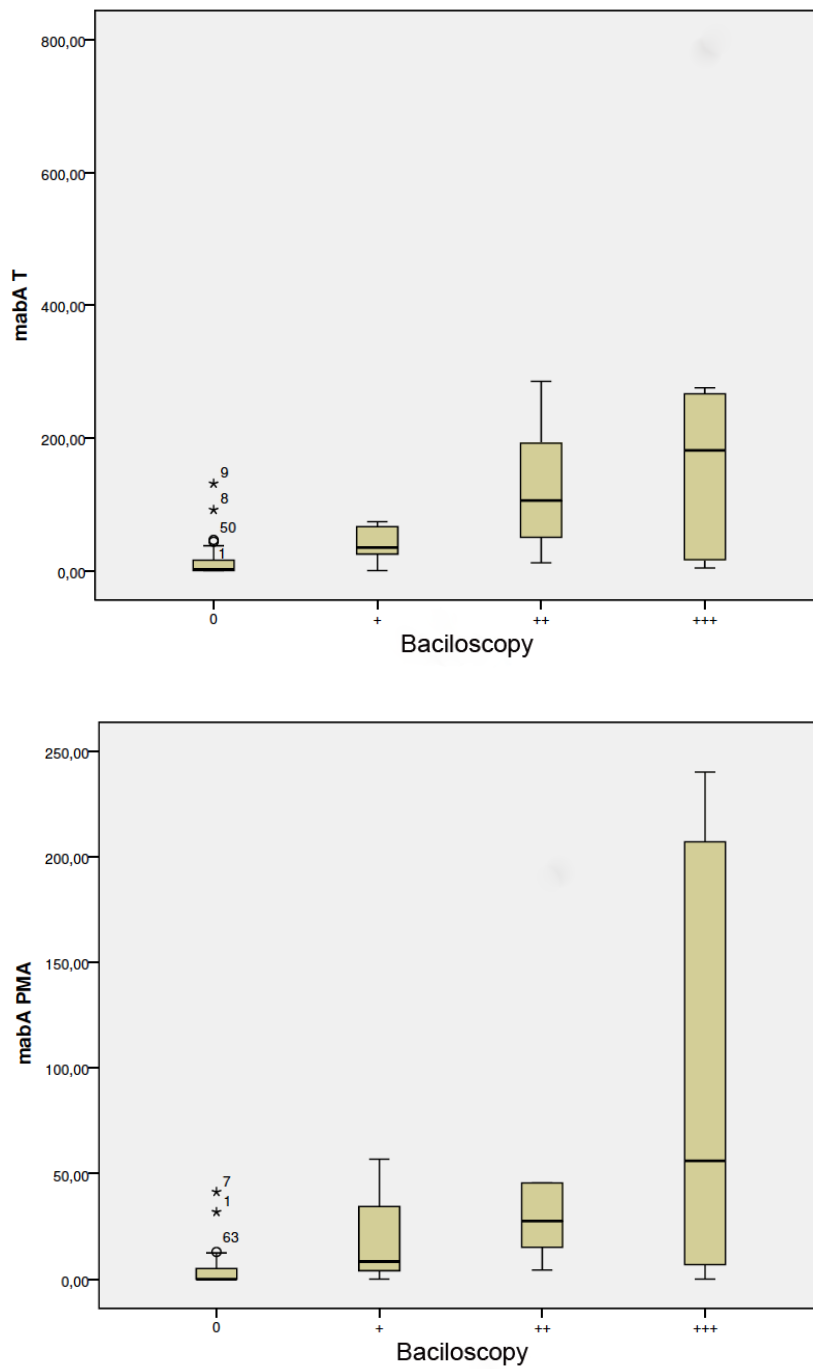


Figure 5. Boxplots and correlation between R-T PCR counts and bacilloscopy. For total *M. tuberculosis* counts without PMA (upper panel), Spearman rho=0.606, P<0.01; in the presence of the PMA intercalating dye (lower panel) Spearman rho =0.552, P<0.01.

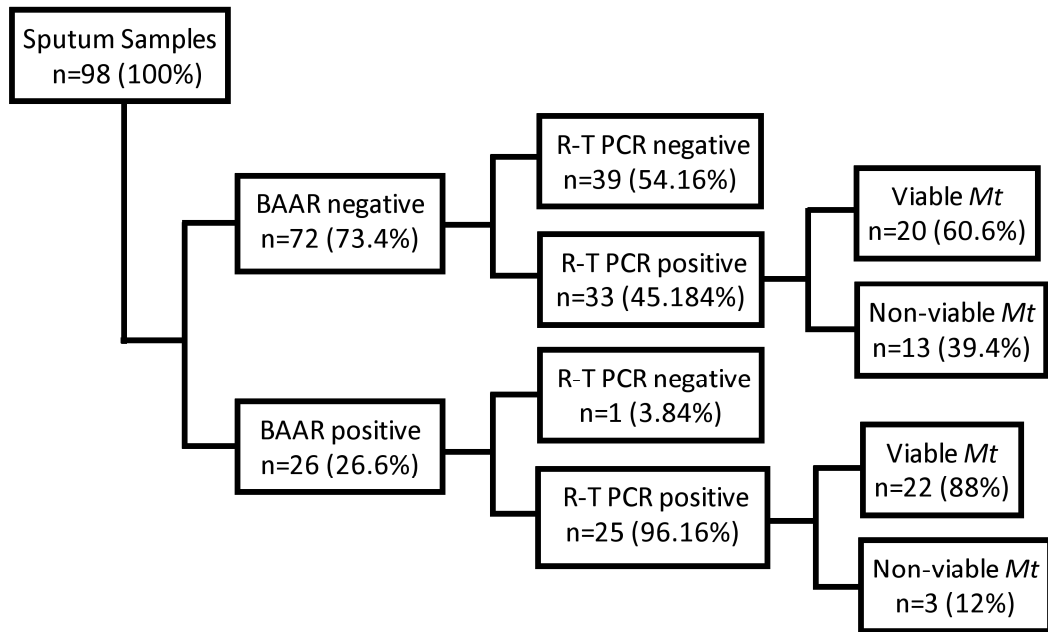


Figure 6. Outcome of BAAR and R-T PCR detection in sputum samples.

Capítulo 3

Considerações
finais

Considerações Finais

Escolhemos a região intergênica do gene *inhA-mabA*, como gene identificador, a partir da determinação de sequências específicas e não homólogas a outros patógenos e mesmo a genes de eucariotos. Após a identificação de sítios específicos do gene citado, *primers* e sondas conjugadas a fluoróforo (Sistema TaqMan, Applied Biosystems) foram desenhados, validados e sintetizados. Essa região foi escolhida devido à sua importância na biossíntese dos ácidos micólicos, importante para a sobrevivência do bacilo (Sacco et al., 2007). Até o presente momento, a maioria dos trabalhos utiliza genes de múltiplas cópias no genoma como identificadores (Desjardim et al., 1998; Takakura et al., 2005) superestimando desta forma o número total do bacilo nas amostras. Luo e colaboradores fizeram um estudo comparando genes de única e múltipla cópia no genoma do *M. tuberculosis* e a sensibilidade foi de 26% e 54% respectivamente, porém o estudo era somente qualitativo (Luo et al., 2010).

A enzima *inhA*, ou 2-trans-Enoil-ACP (CoA) redutase de MTB, catalisa a redução NADH dependente de ácidos graxos α,β -insaturados, precursores dos ácidos micólicos (importantes componentes do envelope celular do *M. tuberculosis*). Mutações no gene estrutural da *inhA* estão associadas à resistência in vivo à INH devido a uma menor afinidade pela molécula de NADH, sugerindo que o mecanismo de resistência deva estar relacionado com interações específicas entre a enzima e o cofator (Schroeder et al., 2005). As regiões alvo do nosso ensaio não abrangem nenhum ponto de mutação no gene *inhA*, por este motivo nesse trabalho não é possível identificar cepas resistentes do *M.tuberculosis*, para isso seria necessário o desenho de novas sondas, algo que nesse momento não constitui o foco do presente projeto.

A construção de padrões de DNA para o desenvolvimento da curva padrão, iniciou com o desenho de *primers* flanqueadores de regiões acima e abaixo dos *primers forward* e *reverse* do ensaio TaqMan. Esses oligonucleotídeos foram utilizados para amplificar as regiões intergênicas já citadas do DNA genômico de *Mt H37Rv* por PCR (anexo 1). A banda da canaleta 2 do gel da amplificação da região intergênica *mabA-inhA* (anexo 1) foi isolada do gel de agarose, purificada e ligada em um vetor de clonagem pCR[®]-Blunt (Invitrogen).

O vetor recombinante foi usado para transformação em células de *E. coli* através de eletroporação e estas foram semeadas em agar Luria Bertani (LB), contendo ampicilina (50 µg/ml). Posteriormente, estas foram incubadas à 37°C por 12 horas. As colônias crescidas foram propagadas em 5 mL de caldo LB contendo ampicilina (50 µg/ml) para crescimento em agitação a 37°C por 12 horas. A cultura foi centrifugada (10.000 RPM) e o pellet foi lisado para a purificação plasmidial. A concentração de DNA foi determinada por fluorimetria. O plasmídeo recombinante a ser empregado como padrão de quantificação foi analisado por eletroforese (anexo 2) e purificado.

O número de células de *M. tuberculosis* foi determinado pelo processo de PCR em tempo real com sondas TaqMan específicas para a região intergênica selecionada. O DNA de *M. tuberculosis* quantificado foi adicionado a poços de PCR em uma diluição seriada de 10⁶ a 10² células. A reação foi realizada em termociclador conectado à interface computadorizada (ABI 7500, Applied Biosystems) e a fluorescência foi monitorada durante a reação. Os resultados são mostrados no anexo 3, esse tipo de construção de curva padrão já foi descrito por outros grupos para quantificar bactérias em amostras orais (Rupf et al., 1999; Lyons et al., 2000). Para cada placa de PCR-RT foi realizada

uma curva padrão contendo os DNAs sintetizados, todos os coeficientes de correlação foram maiores que 0.985.

Para verificar a viabilidade celular foram testadas diferentes concentrações de EMA e PMA. O uso do EMA se mostrou eficiente para inibição da amplificação de células mortas, porém o tratamento também resultou em uma perda de aproximadamente 60% das células viáveis já na sua menor concentração testada. Este resultado corrobora com outros estudos em que o EMA também apresentou esse efeito (Nocker et. al., 2006; Cawthorn & Witthunn, 2010), a dimensão que isto ocorre varia para cada organismo (Nocker & Camper, 2009). Nossos resultados mostraram um aumento do efeito do PMA sobre células mortas de acordo com o aumento da sua concentração. Pholwat e colaboradores mostraram que a concentração de 50 e 100 μM de PMA inibiu completamente a amplificação de $7,5 \times 10^4$ células após tratamento com calor. Porém, eles também demonstraram que a concentração de 100 μM tem a capacidade de penetrar em células íntegras (Pholwat et al., 2011). Nossos resultados mostraram que a maior diferença entre números de *M. tuberculosis* vivos e mortos foi mostrado na concentração de 100 μM de PMA. Esta diferença de concentração encontrada pelo nosso grupo pode estar relacionada ao grande número de células de *M. tuberculosis* utilizada em nosso estudo ($1,25 \times 10^8$ células), necessitando desta forma de uma concentração maior do intercalante para obter um resultado satisfatório. O PMA ainda mostrou não penetrar na membrana de células vivas (íntegras) e isto pode ser explicado pelo fato do PMA ter uma carga maior (duas cargas positivas comparada a uma do EMA) e desta forma se ligar mais seletivamente ao DNA (Noecker et al., 2006; Nocker & Camper, 2009).

Para aumentar a eficiência do EMA e do PMA outros grupos testaram diferentes tempos de incubação da amostra junto aos intercalantes, diferentes tempos de exposição à luz de halogênio e tratamentos sucessivos (Nocker & Camper, 2006; Kralik et al., 2010). Como provamos experimentalmente que o EMA penetra em células vivas, fizemos experimentos de otimização somente com o PMA. Foram testados tempos de incubação da amostra com o intercalante de 5 e 10 min no gelo e protegidas da luz, com eventuais spins da amostra em aparelho agitador tipo vórtex. Como se pode observar (Figura 3 do artigo) não teve diferença significativa entre os dois grupos, por isso o menor tempo de incubação foi o escolhido para dar continuidade aos experimentos. Foi avaliado também diferentes tempos de exposição das amostras (já incubadas previamente por 5 min com o PMA) à lâmpada de halogênio de 650W. Os tempos escolhidos foram de 1, 2 e 5 min. O tempo de 5 minutos foi excluído da análise, pois a lâmpada de halogênio super aqueceu as amostras e alguns tubos de polipropileno acabaram derretendo devido ao excesso de calor produzido. Foram incluídos na análise os tempos de 1 e 2 minutos (Figura 3 do artigo). Como se pode notar não houve diferença significativa entre os grupos, porém ocorreu uma pequena diminuição no número de *M. tuberculosis* do grupo de células viáveis que ficaram expostas por 2 min à lâmpada de halogênio. Isso pode ter acontecido em decorrência do calor gerado no experimento.

Amostras de escarro por apresentarem uma consistência viscosa e regiões mais purulentas (onde se encontram grande parte dos bacilos agragados), são descontaminadas e digeridas com uma solução de N-acetil-L-cisteína (NALC) e hidróxido de sódio (NaOH) descrita por Kent & Kubica (Kent

& Kubica, 1985). O NALC é um composto mucolítico que atua diretamente sobre as características reológicas do muco, destruindo as pontes dissulfeto das macromoléculas mucoprotéicas presentes no escarro. Esta ação farmacológica realiza-se graças à presença de um grupo sulfidrílico (-SH) livre na molécula que lhe proporciona a sua atividade biológica. A ação determina a formação de moléculas com um peso molecular inferior, o que contribui para uma maior fluidez do muco ao reduzir a sua viscosidade (Brasil, 2008). O NaOH, por sua vez, tem ação descontaminante, importante no pré-tratamento da amostra antes de fazer cultura; porém já foi provado que o uso do NaOH afeta a viabilidade do bacilo da TB (Kent & Kubica, 1985; Yajko et al., 1998; Grandjean et al., 2008), sem afetar a sua detecção na PCR (Yajko et al., 1998). Como um dos alvos do nosso trabalho é verificar a viabilidade dos bacilos, optamos por não usar NaOH no tratamento das amostras. Nossos resultados mostraram que o uso do NALC na proporção de 25% do volume inicial da amostra não afetou a viabilidade celular e continua tendo sua ação mucolítica. Ao final do tratamento com NALC são realizadas lavagens com PBS para retirar resquícios do NALC e não afetar a eficiência do PMA.

Nosso projeto foi aprovado pelo comitê da Escola de Saúde Pública de Porto Alegre (anexo 4). De maio a agosto de 2010, 98 pacientes que deixaram amostra de escarro no Hospital Sanatório Partenon foram entrevistados e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 5). A idade dos pacientes incluídos no projeto variou de 17 a 88 anos, com média de 38,71 anos. Em relação ao sexo 36% foram do sexo feminino, enquanto 64% do sexo masculino. Ao analisar o prontuário destes pacientes em tratamento verificou-se que 32,65% já haviam tido TB no passado e 52,04% estavam em tratamento

anti-TB e que 62% destes estavam fazendo o tratamento pela primeira vez. As amostras de escarro coletadas no laboratório de fisiologia do HSP eram encaminhadas ao laboratório de análises clínicas da mesma instituição para a realização do exame direto de baciloscopia. Os resultados da coloração ZN variaram de negativo a positivo +++.

Nosso método de detecção do *M. tuberculosis* por PCR em tempo real foi capaz de detectar 25 das 26 amostras positivas para baciloscopia (sensibilidade de 96%) e 33 das 72 amostras negativas para baciloscopia, sendo desta forma 46% mais sensível que a coloração ZN. Quando separadas por grupos, de acordo com o resultado da baciloscopia, pode-se notar que a média de *M. tuberculosis* encontrados pelo R-T PCR varia proporcionalmente com o resultado da baciloscopia. Obtivemos amplificação de 59 amostras sem tratamento com PMA e 42 duas destas amostras tiveram amplificação após o tratamento com o intercalante. As 16 amostras não detectadas após o tratamento com PMA foram de pacientes que já haviam iniciado o tratamento anti-TB. Esse achado é relevante uma vez que já foi mostrada a diminuição da viabilidade do bacilo após o início do tratamento (Desjardin et al., 1998), o que sugere que a abordagem molecular pode ser uma importante ferramenta de monitoramento da terapia anti-TB. Alguns pacientes que apresentaram resultado positivo após tratamento com PMA também já haviam iniciado o tratamento anti-TB, o que de alguma forma pode indicar uma falha da ação do mesmo, porém este dado não foi investigado com maiores detalhes por questões logísticas.

Apesar de reunir características que o credencie como um método promissor para o diagnóstico rápido da tuberculose, estamos cientes que este

trabalho ainda necessita ser aperfeiçoado em alguns aspectos, como realizar cultura das amostras de escarro analisadas e comparar seus resultados com R-T PCR. Também temos como perspectivas aumentar o número de amostras de pacientes iniciando, ou re-iniciando o tratamento anti-TB e verificar a eficácia do mesmo. Ainda consideramos que nosso sistema deva ser submetido a um estudo multicêntrico, para verificar sua performance no diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar e, assim, poder ser utilizado como um adjuvante nos centros de tratamento da tuberculose. Fundamental também será adaptar o sistema para detecção de *M. tuberculosis* resistentes a terapia a partir da seleção de regiões potencialmente mutadas.

Referências

Referências

Abe C, Hirano K, Wada M, Kazumi Y, Takahashi M, Fukasawa Y, Yoshimura T, Miyagi C, Goto S. "Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test." *J Clin Microbiol.*, 31 de Dec de 1993: 31(12):3270-4.

Andersen, P. "Vaccine strategies against latent tuberculosis infection." *Trends Microbiol*, 2006: (15):7-13.

Badak FZ, Goksel S, Sertoz R, Nafile B, Emertcan S, Cavusoglu C, Bilgic A. "Use of nucleic acid probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from MB/BacT bottles." *J Clin Microbiol*, 1999: 1602-1605.

Basso LA, Blanchard JS. "Resistance to antitubercular drugs." *Adv Exp Med Biol.*, 1998: 456:115-144.

Bethlem N, Bethlem EP, Ribeiro SN, Gerhardt Filho G, Lapa e Silva JR, Muzy de Souza GR, Côrrea JC, Magarão SL, Gontijo Filho PP, Fonseca LS, Sant'anna CC, Hajar MA. "Tuberculose. ." *In: Newton Bethlem, editor. Pneumologia. 4 ed. São Paulo: Atheneu., 1995: 379-448.*

Brasil, Ministério da Saúde. "COORDENAÇÃO NACIONAL DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA. SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. II Consenso brasileiro de tuberculose." *J Bras Pneumol*, 2004: v. 30, supl. 1, 2004.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relatório de situação: Rio Grande do Sul. Brasília, 2007.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em. "Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias. Brasília." 2008.

Bravo LT, Tuohy MJ, Ang C, Destura RV, Mendoza M, Procop GW, Gordon SM, Hall GS, Shrestha NK. "Pyrosequencing for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to rifampin, isoniazid, and fluoroquinolones." *J Clin Microbiol.*, Dec de 2009: 47(12):3985-90. Epub 2009 Oct 21.

Burrill J, Williams CJ, Bain G, Conder G, Hine AL, Misra RR. "Tuberculosis: a radiologic review." *Radiographics*, 27 de Sep-Oct de 2007: (5):1255-73.

Bustin, SA. "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *J Mol Endocrinol.*, 25 de Oct de 2000: (2):169-93.

Cattamanchi A, Nahid P, Marras TK, Gotway MB, Lee TJ, Gonzalez LC, Morris A, Webb WR, Osmond DH, Daley CL. "Detailed analysis of the radiographic presentation of *Mycobacterium kansasii* lung disease in patients with HIV infection." *Chest.*, Apr de 2008: 133(4):875-80. Epub 2008 Feb 8.

Chan ED, Heifets L, EMAN M. D. "Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. ." *Tuber Lung Dis*, 2000: 131-140.

Cawthorn DM, [HYPERLINK](#)
"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Witthuhn%20RC%22%5BAuthor%5D" Witthuhn RC . " Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide." [HYPERLINK](#) "javascript:AL_get(this,%20'jour',%20'J%20Appl%20Microbiol.');" \o "Journal of applied microbiology." *J Appl Microbiol.* 2008 Oct;105(4):1178-85. Epub 2008 Jul 8.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jage. "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence." *Nature*, 11 de Jun de 1998: 393(6685):537-44. Erratum in: *Nature* 1998 Nov 12;396(6707):190.

Collins FM. " Tuberculosis: the return of an old enemy." *Critical Rev Microbiol* , 1993: 19: 1-16.

Dannenber AM. "Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis." *Rev Infect Dis*, 1989:]369 – 378.

Desjardin LE, Chen Y, Perkins MD, Teixeira L, Cave MD, Eisenach KD. "Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis." *J Clin Microbiol.*, 1998 Jul: 36(7): 1964-8.

Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. "The resumption of consumption - A review on tuberculosis. ." *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 2006: 101(7): 697-714.

Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P, Hopewell P, Horsburgh CR, Salfangi M. "Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children." *Am J Respir Crit Care Med*, 2000: 1376-1395.

Furin JJ, Johnson JL. " Recent advances in the diagnosis and management of tuberculosis." *Curr Opin Pulm Med*, 2005: 189-194.

Garay SM. "Pulmonary tuberculosis." *In Rom, W.N.; Garay, S. (Ed). Tuberculosis. USA: Lippincott Williams & Wilkins*, 2004: 345-394.

Grandjean, L., Martin, L., Gilman, R.H., Valencia, T., Herrera, B., Quino, W., Ramos, E., Rivero, M., Montoya, R., Escombe, A.R., *et al.* (2008). Tuberculosis diagnosis and multidrug resistance testing by direct sputum culture in selective broth without decontamination or centrifugation. *J Clin Microbiol* 46, 2339-2344.

Hopewell PC, Bloom BR. "Tuberculosis and other mycobacterial diseases." *n: Murray JF, Nadel JA, editores. Textbook of Respiratory Medicine. 2a ed. Philadelphia: Saunders, 1994: 1094-1244.*

Kent TP, Kubica G. "Public health mycobacteriology – a guide for level III laboratory." *Atlanta, Centers for Disease Control, 1985: (publication nº PB 86-216546).*

Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. "The challenge of new drug discovery for tuberculosis." *Nature.*, 27 de Jan de 2011: 469(7331):483-90.
Kraus G, Cleary T, Miller N, Seivright R, Young AK, Spruill G, Hnatyszyn HJ. "Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR." *Mol Cell Probes.*, 2001.

Kralik, P., Nocker, A., and Pavlik, I. (2010). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. *Int J Food Microbiol* 141 Suppl 1, S80-86.

Kritski, A. & Mello, F.A.F. "Chapter 15: Tuberculosis in Adults." *In: Palomino. J.C.: Leão, S.C.: Ritacco, V. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007. 1º Edição.*, 2007: TuberculosisTextbook.com.

Lee JL, Levin RE. "A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets." *J Microbiol Methods.*, 2009: 76(1):93-6. Epub 2008 Sep 5.

Liberato IR, de Albuquerque MF, Campelo AR, de Melo HR. "Characteristics of pulmonary tuberculosis in HIV seropositive and seronegative patients in a Northeastern region of Brazil." *Rev Soc Bras Med Trop*, 2004: 46 – 50.

Lighter J, Rigaud M. "Diagnosing childhood tuberculosis: traditional and innovative modalities." *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2009: 39(3):61-88.

Luo RF, Scahill MD, Banaei N. "Comparison of single-copy and multicopy real-time PCR targets for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin-embedded tissue." *J Clin Microbiol* 2010 ;48(7):2569-70. Epub 2010 May 12.

Lyons, S.R., Griffen, A.L., and Leys, E.J. (2000). Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol* 38, 2362-2365.

Marrakchi H, Ducasse S., Labesse G., Montrozier H., Margeat E., Emorine L., Charpentier X., Mamadou D. , Que´mard A. "MabA (FabG1), a *Mycobacterium*

tuberculosis protein involved in the long-chain fatty acid elongation system FAS-II." *Microbiology*, 2002: 951-960.

Massire C, Agasino Ivy C, Lovari R, Kurepina N, Li H, Blyn LB, Hofstadler SA, Khechinashvili G, Stratton CW, Sampath R, Tang YW, Ecker DJ, Kreiswirth BN. "Simultaneous mycobacterial speciation and determination of tuberculosis drug resistance by PCR/ESI-MS." *J Clin Microbiol.*, 2010: [Epub ahead of print].

Matteelli A, Migliori GB, Cirillo D, Centis R, Girard E, Raviglione M. "Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control." *Expert Rev Ant Infect Ther.*, 2007 : (5):857-71.

Min JW, Yoon HI, Park KU, Song JH, Lee CT, Lee JH. "Real-time polymerase chain reaction in bronchial aspirate for rapid detection of sputum smear-negative tuberculosis." *Int J Tuberc Lung Dis.*, 2010 .

Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. "The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases." *Nature*, 2004: 430(6996):242-9.

Moure R, Muñoz L, Torres M, Santin M, Martín R, Alcaide F. "Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and Rifampin Resistance in Smear-negative Clinical Samples using an Integrated Real Time PCR Method." *J Clin Microbiol.*, 2010: [Epub ahead of print].

Musher DM. "How contagious are common respiratory tract infections?" *N Engl J Med*, 2003: 1256 – 1266.

Narain JP, Lo YR. "Epidemiology of HIV-TB in Asia." *Indian J Med Res*, v. 120, n. 4, p. 277 – 289, 2004.

Nocker A, Camper AK. "Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide." *Appl Environ Microbiol.*, 2006: 72(3):1997-2004.

Nocker A, Cheung CY, Camper AK. "Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. ." *J Microbiol Methods.*, 2006: 67(2):310-20. Epub 2006 Jun 5.

HYPERLINK

"<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Nocker%20A%22%5BAuthor%5D>"

Nocker A , HYPERLINK

"<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Camper%20AK%22%5BAuthor%5D>

" Camper AK . "Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques." *FEMS microbiology letters* 2009 Feb;291(2):137-42. Epub 2008 Nov 21.

Nunn P, Williams B, Floyd K, Dye C, Elzinga G, Raviglione M. "Tuberculosis control in the era of HIV." *Nat Rev Immunol*, 2005: 819 - 826.

Nunn P, Zignol M, Jaramillo E, Wright A, Getahun H. "Tb drug resistance: is it really a threat to Africa? ." *Ethiop Med J.*, 2007: 399-404.

Palomino JC. "Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field." *Eur Respir J*, 2005: 339-350.

Pao CC, Yen TS, You JB, Maa JS, Fiss EH and Chang CH. "Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification." *J. Clin. Microbiol.*, 1990: 28:1877-80.

Parashar D, Chauhan DS, Sharma VD, Katoch VM. "Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research." *Indian J Med Res.*, 2006: 124(4):385-98.

Pholwat S, Heysell S, Stroup S, Foongladda S, Houghton E. (2011). Rapid first- and second-line drug susceptibility assay for *Mycobacterium tuberculosis* isolates by use of quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 49(1):69-75.

Ramirez MV, Cowart KC, Campbell PJ, Morlock GP, Sikes D, Winchell JM, Posey JE. "Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis." *Clin Microbiol.*, Nov de 2010: 48(11):4003-9. Epub 2010 Sep 1.

Raviglione MC, Harries AD, Msiska R, Wilkinson D, Nunn P. "Tuberculosis and HIV: current status in Africa. ." *AIDS*, 1997: Suppl B:S115-23.

Rupf, S., Merte, K., and Eschrich, K. (1999). Quantification of bacteria in oral samples by competitive polymerase chain reaction. *J Dent Res* 78, 850-856.

Sacco E, Covarrubias AS, O'Hare HM, Carroll P, Eynard N, Jones TA, Parish T, Daffé M, Bäckbro K, Quémard A. "The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*." *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2007: 104(37):14628-33. Epub 2007 Sep 5.

Schirm J, Oostendorp LA, Mulder JG. "Comparison of Amplicor, in-house PCR, and conventional culture for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. ." *J Clin Microbiol*, 1995: 3221-3224.

Schroeder, E.K., Basso, L.A., Santos, D.S., and de Souza, O.N. (2005). Molecular dynamics simulation studies of the wild-type, I21V, and I16T mutants of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase (InhA) in complex with NADH: toward the understanding of NADH-InhA different affinities. *Biophys J* 89, 876-884.

Steingart KR, Ng V, Henry M, et al. "Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review." *Lancet Infect Dis*, 2006: 6: 664-74.

Stewart GR, Robertson BD, Young DB. "Tuberculosis: a problem with persistence." *Nat Rev Microbiol*, 2003: 1(2):97-105.

Takakura S, Tsuchiya S, Isawa Y, Yasukawa K, Hayashi T, Tomita M, Suzuki K, Hasegawa T, Tagami T, Kurashima A, Ichiyama S. "Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by transcription-reverse transcription concerted reaction with an automated system." *J Clin Microbiol.* , 2005: 43(11):5435-9.

Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL Jr, Wolfe DM, Llorin OJ, Passen S. "Processing respiratory specimens with C18-carboxypropylbetaine: development of a sediment resuspension buffer that contains lytic enzymes to reduce the contamination rate and lecithin to alleviate toxicity." *J Clin Microbiol*, 1998: 36(7):2004-13.

WHO, World Health Organization. "Laboratory services in tuberculosis control. Part I. Organization and Management". Geneva. Switzerland. WHO/TB/98.258. 1998.

WHO, World Health Organization. "Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. Who report." Geneva, Switzerland, 2010.

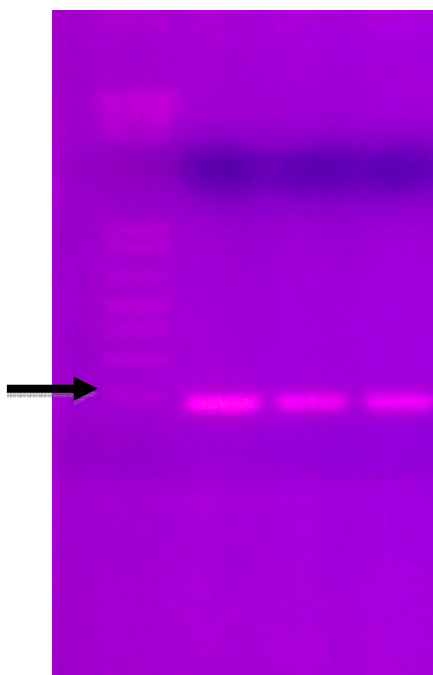
Yajko DM, Wagner C, Tevere VJ, Kocagöz T, Hadley WK, Chambers HF. "Quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical sputum specimens and dilution endpoint of its detection by the Amplicor PCR assay." *J Clin Microbiol.*, 1995: 33(7):1944-7.

Zager EM, McNerney R. "Multidrug-resistant tuberculosis." *BMC Infec Dis*, 2008: 8:10.

Zahrt TC. "Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection." *Microbes Infect.* , 2003 : 5(2):159-67.

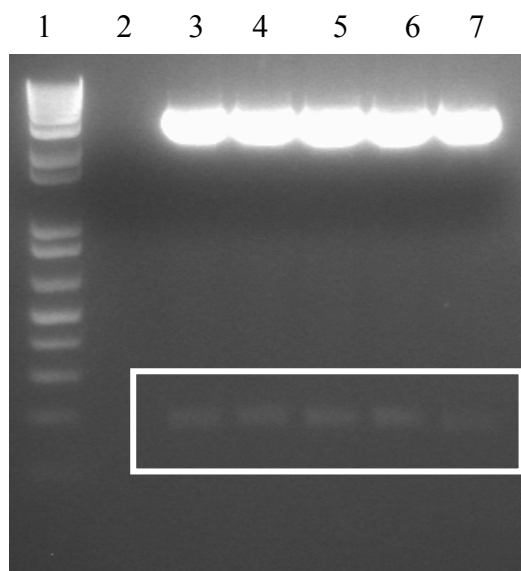
Anexos

Anexo 1



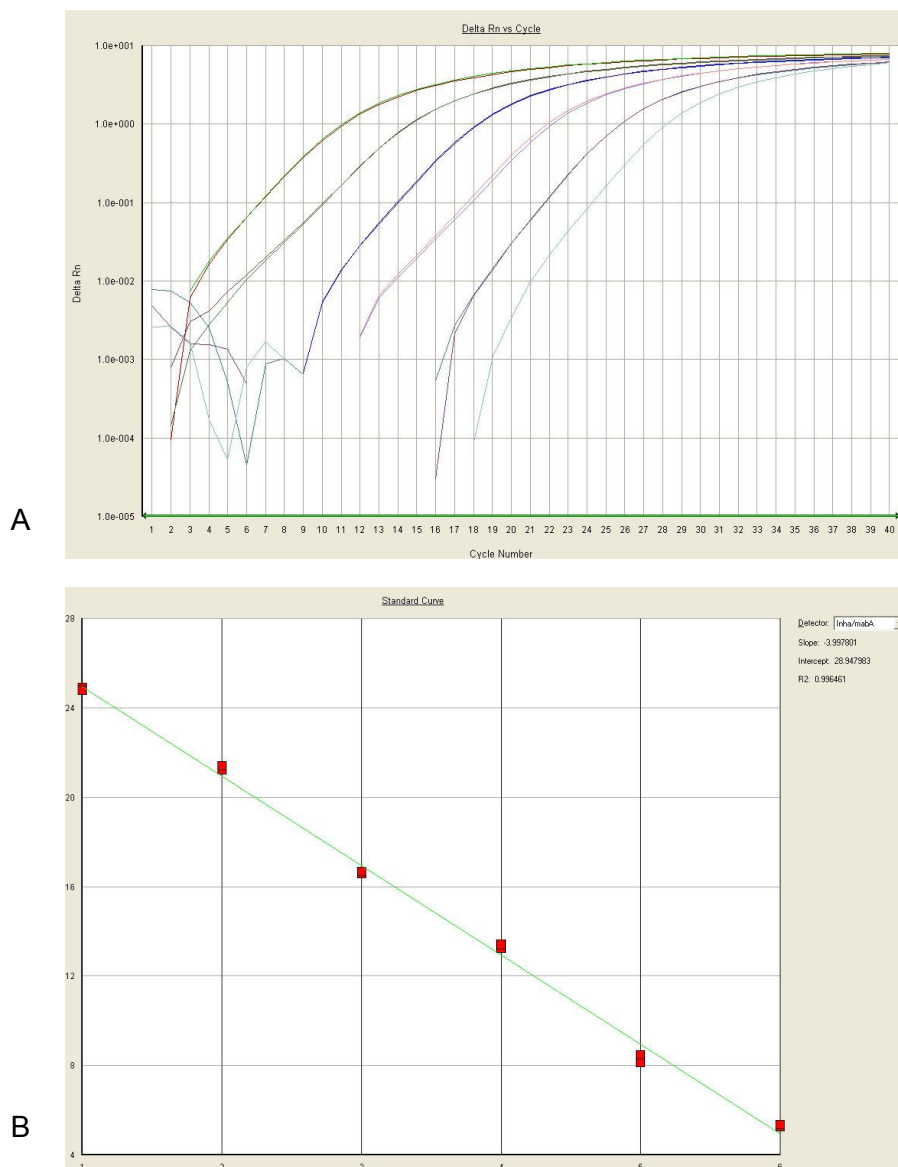
Eletroforese em gel de agarose a 2%. Amplificação da região intergênica *mabA-inhA*. Canaleta 1: Marcador 1kb Plus. Canaletas 2, 3 e 4: Fragmento de 200 pb amplificados na ausência, com 5% e 10% de DMSO respectivamente.

Anexo 2:



Eletroforese em gel de agarose a 2%. Clivagem do Blunt com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* com liberação do inserto de aproximadamente 200pb. Canaleta 1: Marcador 1kb Plus. Canaletas 3, 4, 5 6 e 7: liberação do fragmento de aproximadamente 200pb.

Anexo 3:



Amplificação do DNA plasmidial de *M. tuberculosis*. A diluição seriada do DNA da região intergênica *mabA-inhA* de *M. tuberculosis* foi usada como padrão para a quantificação absoluta. Amplificação inicial das concentrações mais altas dos plasmídeos (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1). (A) Amplificação do DNA plasmidial, a primeira amplificação representa a concentração mais alta, seguida das outras concentrações. (B) Uma curva padrão foi gerada a partir dos dados da amplificação gerando um coeficiente de correlação de 0.9964.

Anexo 4



ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA SAÚDE

Of. CEP/ESP-055/2010

Porto Alegre, 03 de Maio de 2010.

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética na Pesquisa em Saúde da Escola de Saúde Pública da Secretaria da Saúde do Rio Grande do Sul apreciou e **aprovou** o seu protocolo de pesquisa intitulado: "**Otimização da tecnologia de fluorescência associada à reação em cadeia da DNA polimerase (PCR em tempo real) para diagnóstico molecular da tuberculose**". Diante disso, considerou que o mesmo tem relevância para a ciência e encontra-se ética e metodologicamente adequado.

Solicitamos que, ao final da pesquisa, seja entregue uma via para esse Comitê.

Maria Isabel Barros Bellini
Coordenadora do Comitê de Ética na Pesquisa em Saúde
da ESP/SES/RS

A(o)
Pesquisador(a)
Thiago Milech de Assunção
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)
N/C

Av. Ipiranga, 6311 - Bairro Partenon - CEP 90.610-001 - Porto Alegre - RS
Telefone: (51) 3901.1533 - Fax: 3801.1493 - E-mail: [ceps-
esp@saude.rs.gov.br](mailto:ceps-esp@saude.rs.gov.br)

Termo de Consentimento

Nome do paciente: _____

Prontuário n°: _____

Questionário n°: _____

Título da pesquisa:

OTIMIZAÇÃO DA TECNOLOGIA DE FLUORESCÊNCIA ASSOCIADA A REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR EM TEMPO REAL) PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA TUBERCULOSE.

Objetivo:

A tuberculose é uma doença muito frequente em nosso meio, atingindo um grande número de pessoas. A determinação de fatores relacionados à biologia desta doença podem trazer informações sobre sua evolução, diagnóstico clínico a curto e a longo prazo e tratamento. O presente estudo tem o objetivo de testar uma metodologia nova de diagnóstico mais rápido e eficaz da tuberculose, através da verificação da presença bacilos em escarro de pacientes com suspeita da doença.

Procedimento:

Os voluntários que decidirem participar deste estudo serão entrevistados para responderem algumas questões referentes à sua pessoa.

Será coletado, na sua consulta para exame de baciloscopia, uma parte do escarro, que será solicitado para a verificação da presença de bacilos, que indicam a presença da tuberculose. A amostra remanescente será utilizada para testar uma nova metodologia de diagnóstico.

Riscos e desconfortos:

O procedimento de baciloscopia é sempre realizado, não causa desconfortos e não há riscos para a sua saúde, uma vez que o único procedimento a ser realizado é a coleta de seu escarro. Como utilizaremos uma parte escarro coletado na consulta, é importante ressaltar que nenhum

risco adicional pode existir com relação a nossa solicitação, e essa amostra será de grande importância para estudar o bacilo da tuberculose.

Desistência na participação do estudo:

A participação de cada indivíduo neste estudo é voluntária, ou seja, quem não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo, sem que haja qualquer perda no atendimento dos problemas de saúde a que tem direito. Caso seja de sua vontade, poderá em qualquer momento, mesmo após ter concordado (em um primeiro instante), desistir da participação no trabalho, sem qualquer comprometimento no seu tratamento.

Compensação financeira:

Não haverá nenhum pagamento financeiro para a participação neste estudo.

Confidencialidade das informações:

Toda a informação que será fornecida pelos participantes do estudo e o resultado dos exames será considerada confidencial e somente será conhecida pela equipe envolvida no estudo. Seus dados do questionário serão mantidos em arquivos fechados. Seu número será a única conexão com a informação coletada.

Dúvidas relacionadas ao estudo:

Qualquer dúvida quanto a este trabalho, tanto por parte do paciente, como de qualquer familiar, será prontamente esclarecida por um dos membros da equipe deste estudo. Se por acaso você tiver dúvidas ou queira relatar algum fato relacionado ao exame, ligue para o responsável pelo projeto, Dr. Eraldo L. Batista Jr., Professor da PUCRS, tel.: 51 3320-3629/ 93510224.

Autorização para estocagem de material biológico:

Permito que minha amostra de escarro seja guardada para ser utilizada no projeto de pesquisa: "Otimização da tecnologia de fluorescência associada à reação em cadeia da DNA polimerase (PCR em tempo real) para diagnóstico

molecular da tuberculose”, ficando no entanto livre para solicitar a destruição da mesma, a qualquer momento, se assim desejar;

(Sem a minha identificação e/ ou mantendo minha privacidade)

() Sim permito.

() Não permito que minha amostra seja utilizada no estudo acima citado.

Garantimos que os seus dados de identificação serão de total sigilo. Garantimos também que a participação ou não neste estudo não influenciará qualquer modificação no tratamento e atenção propostos por seu médico assistente. Não há nenhum custo financeiro para a participação neste estudo.

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador

Data ___/___/___