

AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS E MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. EM ÁGUAS TRATADAS NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GOIÁS-BRASIL<sup>1</sup>

Sônia de Fátima Oliveira Santos<sup>2</sup>

*Cryptosporidium* spp. é um parasito oportunista emergente e responsável por um grande número de surtos de diarreia em humanos em todo o mundo. A deficiência de técnicas padronizadas para a detecção deste parasito dificulta o esclarecimento e, conseqüentemente, ocorre a subnotificação de casos. Este estudo teve como objetivos avaliar técnicas imunológicas de detecção de antígeno e compará-las com uma PCR em tempo real para detecção e diferenciação de *Cryptosporidium* spp. em águas tratadas na cidade de Goiânia; analisar na literatura científica a ocorrência do *Cryptosporidium* spp e as metodologias mais utilizadas para sua detecção. As coletas das amostras foram feitas diretamente das torneiras das residências em galões para 5L em 4 pontos preestabelecidos nas regiões norte, sul, leste e oeste da cidade, totalizando 32 amostras. Após a coleta, elas foram encaminhadas ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP/UFG) e ao Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular (LDGM-ICB/UFG) para análise. A concentração foi feita utilizando-se membrana de nylon de 0,45 µm carregada positivamente e a análise, pelas técnicas de Imunofluorescência Direta (IFD), ensaio ELISA e PCR em tempo real, com resultados positivos de 56,3%(18/32), 28,1%(9/32) e 50,0%(16/32), respectivamente. Tais resultados demonstram que oocistos de *Cryptosporidium* spp. estão presentes nas águas tratadas do município de Goiânia. Verificou-se, por meio da análise da literatura, que as águas tratadas em algumas regiões/países estão contaminadas com *Cryptosporidium* spp. Quanto ao custo/benefício, a IFD foi a técnica mais econômica e que apresentou melhor desempenho quanto à detecção. Os indicadores microbiológicos não estão correlacionados com a presença do *Cryptosporidium* spp. Embora a PCR em tempo real seja mais onerosa, é a única que permite a identificação por espécie. Provavelmente o ideal seja o uso de ambas as técnicas, considerando-se as características próprias de cada uma.

---

1 Resumo de Tese para defesa de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás sob a orientação do Prof. Dr. Marco Tulio Antonio Garcia-Zapata e Prof. Dr. Carlos Eduardo Anunciação como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde Área de Concentração Patologia, Clínica e Tratamento das Doenças Humanas. Goiânia, Goiás, 2012.

2 Endereço para contato: Caixa Postal 12911 – Setor Leste Vila Nova, 74643-970, Goiânia-GO, Brasil. Email: nupereme@gmail.com; Telefãx: +55 62 3521-1839

## EVALUATION OF IMMUNOLOGICAL AND MOLECULAR TECHNIQUES FOR DETECTION OF OOCYSTS OF *Cryptosporidium* spp. IN TREATED WATER IN THE MUNICIPALITY OF GOIÂNIA-GOIÁS-BRAZIL<sup>1</sup>

*Cryptosporidium* spp. is an emerging opportunistic parasite responsible for a large number of outbreaks of diarrhea in humans around the world. The difficulty of standard techniques for the detection of this parasite leaves to underreporting of cases. The objective of this study was to evaluate and compare immune antigen detection techniques and a real-time PCR for detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp in treated water. Collection of samples was made directly from the residence faucets in gallons of 5 L on four pre-established points in the city (North, South, East and West), totalizing 32 samples. After collection, samples were forwarded to the Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP/UFG) and to the Laboratorio de Diagnóstico e Genética Molecular (LDGM-ICB/UFG) for analysis. Concentration was made using a nylon membrane, 0.45 µm, positively loaded and analyzed by Direct Immunofluorescence Techniques (DIF), ELISA test and real-time PCR. The results were positive at 56.3% (18/32), 28.1% (9/32) and 50.0% (16/32) respectively and demonstrate that oocysts of *Cryptosporidium* spp. are present in treated water from the municipality of Goiania. Search of the literature revealed that treated water in some regions/countries is contaminated with *Cryptosporidium* spp. In relation to the cost/benefit ratio, the cheapest and with better performance was the DIF. Microbiological indicators were not correlated with the presence of *Cryptosporidium* spp. Although real-time PCR is more expensive, it is the only one that allows identifying the species. Probably the ideal will be to use both techniques.

# AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS T REGULATÓRIAS CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> NAS FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS APÓS ESTÍMULO *IN VITRO* COM ANTÍGENOS RECOMBINANTES CRA E FRA DE *Trypanosoma cruzi*<sup>1</sup>

Suellen Carvalho de Moura Braz<sup>2</sup>

Muitos estudos têm associado a resposta imune do hospedeiro ao *Trypanosoma cruzi* com as diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas crônica. Contudo, pouco se sabe sobre o papel das células T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> na infecção humana. Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta imune específica de indivíduos portadores da doença de Chagas diante da estimulação com CRA (Antígeno Repetitivo Citoplasmático) e FRA (Antígeno Repetitivo Flagelar), relacionando a presença dos linfócitos T regulatórios com formas clínicas crônicas da doença. A população do estudo foi selecionada no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz/ Universidade de Pernambuco, sendo constituída por portadores das formas cardíaca severa (CARD) (n=11) e indeterminada (IND) (n=20) da doença e de indivíduos não infectados (NI)(n=9). Células mononucleares de sangue periférico obtidas dos participantes, foram cultivadas na presença de CRA e FRA. A presença de linfócitos T regulatórios foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo. Portadores da IND apresentaram níveis mais elevados de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que os indivíduos com a CARD. Também verificamos maior frequência da molécula CD25 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes com a IND. Não verificamos diferença na expressão de FoxP3 e na produção de IL10 por linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> entre os grupos avaliados. Entretanto, foi observada correlação positiva entre CD25 e IL10 no grupo de indivíduos portadores da IND após estímulo com FRA. Nossos achados sugerem que linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> estão envolvidos no controle dos efeitos deletérios ocasionados pela resposta imune do hospedeiro contra o *T. cruzi*. Contudo, o mecanismo de ação das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, específicas ao CRA e ao FRA, principalmente quanto à produção de citocinas, deve ser avaliado na doença de Chagas crônica.

---

1 Resumo de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) sob a orientação da Dra. Yara de Miranda Gomes e da Dra. Virgínia Maria Barros de Lorena, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, Recife, PE, 2011.

2 Endereço para contato: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP. 50670-420, Recife-PE. E-mail: suellenbraz@cpqam.fiocruz.br

## EVALUATION OF CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> REGULATORY T CELLS IN THE CLINICAL FORMS OF CHAGAS DISEASE AFTER *IN VITRO* STIMULATION WITH CRA AND FRA RECOMBINANT ANTIGENS OF *Trypanosoma cruzi*

Several studies tried to associate host immune response to *Trypanosoma cruzi* with different clinical manifestations of chronic Chagas disease. However, few is known about the role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in human infection. This study aimed to evaluate the specific immune response in individuals with Chagas disease against stimulation with CRA (Cytoplasmic Repetitive Antigen) and FRA (Flagellar Repetitive Antigen), by analysing the presence of regulatory T lymphocytes in different clinical chronic forms of the disease. The study population was selected at the Chagas disease outpatient of Oswaldo Cruz University Hospital at University of Pernambuco, and comprised chagasic patients with severe heart involvement (CARD) (n=11), indeterminate form (IND) (n=20) and uninfected individuals (NI) (n=9). Peripheral blood mononuclear cells from participants, were cultivated with CRA or FRA. Presence of regulatory T lymphocytes was measured by flow cytometry analysis. Patients with IND showed higher level of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells than CARD individuals. We also found a higher frequency of CD25 molecule on CD4<sup>+</sup> T cells from patients with IND. There was no difference in FoxP3 expression and IL10 production by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes among groups. However, a positive correlation between CD25 and IL10 in IND group, after stimulation with FRA was observed. Our findings suggest that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes are involved in control of deleterious effects caused by host immune response against *T. cruzi*. Nevertheless, the mechanism of action of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells, specific to CRA and FRA, especially regarding cytokine production, should be further evaluated in chronic Chagas disease.

# AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE CITOCINAS EM PACIENTES CHAGÁSICOS APÓS ESTÍMULO COM OS ANTÍGENOS RECOMBINANTES CRA E FRA DE *Trypanosoma cruzi*<sup>1</sup>

Adriene Siqueira de Melo<sup>2</sup>

Entre os diversos aspectos relacionados à doença de Chagas, o mecanismo de evolução clínica de indivíduos portadores da forma indeterminada para as formas clínicas sintomáticas ainda não se encontra esclarecido. Sabe-se que a resposta imunológica do hospedeiro que é direcionada ao parasito exerce um papel central no desenvolvimento da doença. Assim, propusemo-nos a avaliar a relação entre a produção de citocinas após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA (*Cytoplasmatic Repetitive Antigen*) e FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*) de *Trypanosoma cruzi* e as formas clínicas crônicas da doença de Chagas. Foram selecionados 19 indivíduos portadores da forma cardíaca (FC) assim distribuídos: 9 portadores da forma cardíaca leve (FCL), 10 portadores da forma cardíaca severa (FCS), e 17 indivíduos portadores da forma indeterminada (FI), todos provenientes do Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco. As células mononucleares do sangue periférico desses indivíduos foram submetidas à cultura na presença de CRA ou FRA por três dias e a expressão gênica para as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, por estas células, foi avaliada por meio da detecção de seu RNA mensageiro por PCR Quantitativa em Tempo Real. Apesar de não ter sido observada diferença significativa na produção destas citocinas entre as formas clínicas estudadas, observamos que a maioria dos portadores da FI apresentou elevados níveis de expressão gênica para IFN-  $\gamma$ , enquanto os portadores da FCL apresentaram elevados níveis de expressão gênica para IL-10. Assim, mesmo sem a diferenciação de um perfil de expressão entre as formas clínicas crônicas, a avaliação de outras citocinas em um número maior de pacientes é necessária para se estabelecer o padrão inflamatório ou anti-inflamatório nestes grupos de indivíduos estudados.

---

1 Resumo de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) sob a orientação da Dra. Yara de Miranda Gomes e da Dra. Cássia Docena, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, Recife, PE, 2011.

2 Endereço para contato: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP. 50670-420, Recife-PE. E-mail: dica\_melo@cpqam.fiocruz.br

## EVALUATION OF CYTOKINE SYNTHESIS IN CHAGASIC PATIENTS AFTER STIMULATION WITH CRA AND FRA RECOMBINANT ANTIGENS OF *Trypanosoma cruzi*

Among several aspects related to Chagas disease, the mechanism by which patients with the indeterminate form progress toward the symptomatic clinical forms has not been elucidated. It is known that the host immune response directed against the parasite, plays a central role in the development of lesions. Thus, we propose to evaluate the relationship between the production of cytokines after *in vitro* stimulation with recombinant antigens CRA (Cytoplasmatic Repetitive Antigen) and FRA (Flagellar Repetitive Antigen) of *Trypanosoma cruzi* and the clinical forms of chronic Chagas disease. We selected 19 patients with the cardiac form (CARD): 9 presenting mild heart compromise (CARD 1), 10 with severe heart involvement (CARD 2), and 17 individuals with the indeterminate form (IND), all of them selected at the Chagas disease out patient of Oswaldo Cruz University Hospital at University of Pernambuco. Peripheral blood mononuclear cells from patients were submitted to culture in the presence of CRA or FRA during three days. The gene expression for the cytokines IFN- $\gamma$  and IL-10 was evaluated by its messenger RNA detection using Quantitative Real Time PCR. Although no significant differences were observed in the production of these cytokines among the clinical forms studied, we found that majority of the patients with the IND showed high levels of IFN- $\gamma$  gene expression, while patients with the CARD 1 showed high levels of IL-10 gene expression. So, even without a differential expression profile among the chronic clinical forms, the evaluation of another cytokines in a larger number of patients is needed, to establish an inflammatory or anti-inflammatory profile in these groups of individuals.

# AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA TÉCNICA EM PCR EM TEMPO REAL EM DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS UTILIZADAS PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR <sup>1</sup>

*Fabiana Cristina Fulco Santos* <sup>2</sup>

Dentre todas as enfermidades infecciosas que acometem o ser humano, a tuberculose (TB), causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, permanece como a mais letal. No Brasil, foram notificados, em 2009, 10.164 novos casos de tuberculose extrapulmonar, sendo 605 no estado de Pernambuco. O controle da doença reside em um acurado diagnóstico e tratamento dinâmico aos doentes que interfira na cadeia de transmissão. Contudo, os métodos diagnósticos convencionais apresentam limitações como baixa sensibilidade e demanda de tempo. Com o objetivo de determinar a sensibilidade e especificidade de técnicas moleculares no diagnóstico da TB, buscou-se avaliar o desempenho da PCR em Tempo Real em diversas amostras de pacientes com suspeita de TB extrapulmonar atendidos nos hospitais públicos de Pernambuco. Foram selecionados 57 pacientes de ambos os sexos com idade entre 1 e 89 anos e suspeita clínica de TB extrapulmonar. O diagnóstico final foi realizado pelo médico com base em critérios epidemiológicos, clínicos e laboratoriais, comparados posteriormente com os resultados da qPCR. Foram analisadas 146 amostras biológicas, incluindo 49 de sangue, 46 de urina, 27 biópsias e 21 de outros líquidos. Dos 57 pacientes, 38 apresentaram diagnóstico final de TB extrapulmonar, sendo 28 amostras positivas na qPCR, com sensibilidade de 73,3% e especificidade de 84,2%. Em relação ao tipo de amostra, o sangue apresentou sensibilidade de 55,9% e especificidade de 80%, a urina de 33,3% e 100%, a biópsia de 43,8% e 100% e outros líquidos de 28,6% e 100%, respectivamente. Quando analisados em conjunto, sangue e/ou urina apresentaram 68,8% de sensibilidade e 78,6% de especificidade, indicando que quanto maior é o número de amostras coletadas, maior é a probabilidade da positividade do teste. A qPCR é uma técnica rápida, sensível e a detecção precoce do *M. tuberculosis* nas amostras biológicas constitui um método bastante útil no diagnóstico, sobretudo de formas extrapulmonares e paucibacilares da doença, e contribui para o controle da doença.

---

1 Resumo de dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), sob orientação da Dra. Haiana Charifker Schindler para obtenção do título de Mestre em Ciências, Recife, Pernambuco, Brasil, 2012.

2 Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Professor Moraes Rêgo, s/n – Campus da UFPE, Recife, PE, Brasil. Email para correspondência: fcfulco@hotmail.com

## ASSESSMENT OF PERFORMANCE OF THE REAL TIME PCR IN DIFFERENT BIOLOGICAL SAMPLES USED FOR DIAGNOSIS OF EXTRAPULMONARY TUBERCULOSIS

Among all infectious diseases that afflict humans, tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, remains the most lethal. In Brazil, 10,164 new cases of extrapulmonary tuberculosis, and 605 in the State of Pernambuco were reported in 2009. Control of the disease lies in an accurate diagnosis and a dynamic treatment to patients, interfering with the transmission chain. However, conventional diagnostic methods have limitations such as low sensitivity and time consuming. In order to determine the sensitivity and specificity of molecular techniques in the diagnosis of TB, we sought to evaluate the performance of Real-Time PCR in samples of patients with suspected extrapulmonary TB treated in public hospitals in Pernambuco. We selected 57 patients of both sex, with age among 1-89 years, with clinical suspicion of extrapulmonary TB. The final diagnosis was established by the physician using epidemiological, clinical and laboratory criteria, and subsequently compared to the results of qPCR. We analyze 146 biological samples, including 49 from blood, 46 from urine, 27 biopsies and 21 from other liquids. Of the 57 patients, 38 had a final diagnosis of extrapulmonary TB, with 28 qPCRs positive, with a sensitivity of 71.8% and specificity of 88%. Regarding the type of sample, the blood had a sensitivity of 55.9% and specificity of 80%, urine 33.3% and 100%, biopsy 43.8% and 100% other liquids 28.6% and 100% respectively. Taken together, blood and / or urine showed 62.9% sensitivity and 73.3% specificity, indicating that the higher the number of samples collected, the greater the likelihood of a positive test. The qPCR is a fast and sensitive method and the early detection of *M. tuberculosis* in biological samples become a useful tool in the diagnosis, especially extrapulmonary and paucibacillary forms, and hence contributing to the control of the disease.