

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR ¹

Lais Ariane de Siqueira Lira ²

A tuberculose constitui um grave problema de saúde pública com repercussão mundial. No Brasil, foram notificados 78.564 casos no ano de 2011, dos quais 83,6% eram da forma pulmonar. Recife foi a capital brasileira com maior taxa de mortalidade específica por tuberculose. O controle da doença consiste em um diagnóstico precoce e eficaz associado a um tratamento adequado, contudo os métodos convencionais apresentam limitações, como a baixa sensibilidade e o resultado tardio. Por isso, métodos moleculares vêm sendo propostos para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas. Recentemente, a técnica da reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) tem sido desenvolvida, apresentando como diferencial a capacidade de ocorrerem simultaneamente amplificação e detecção do DNA por meio de um sistema de fluorescência. O estudo avaliou o desempenho da técnica de qPCR na detecção específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* nos pacientes com tuberculose pulmonar. Para avaliar o limite de detecção, foi construída uma curva de diluição a partir de cepa de referência do *M. tuberculosis*, por meio da qual se verificou que o sistema foi capaz de detectar até 3 bacilos/mL. Esse limite correspondeu ao ciclo de amplificação 30 utilizado como limite máximo de positividade das amostras analisadas. Foram avaliadas 165 amostras de escarro de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar. Tais amostras apresentaram sensibilidade de 87,9% e especificidade de 98%, considerando a cultura e/ou resposta ao tratamento específico como padrão-ouro. A técnica de qPCR demonstrou um excelente desempenho, portanto pode ser utilizada como um método auxiliar para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. O diagnóstico da TB deve estar fundamentado na análise conjunta de vários parâmetros como baciloscopia, cultura, manifestações clínicas e prova terapêutica.

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: lais.liraa@gmail.com

ASSESSMENT OF PERFORMANCE OF THE REAL TIME PCR FOR THE DIAGNOSIS OF PULMONARY TUBERCULOSIS

Tuberculosis is a serious health problem public concern and with worldwide repercussions. On Brazil, 78.564,000 cases were reported in the year 2011, with 83.6% of cases with pulmonary involvement, and Recife was the Brazilian capital with a higher mortality rate, specific for tuberculosis. The disease control is performed with an early and effective diagnosis associated with an appropriate treatment, however, conventional methods have limitations such as low sensitivity and late results. Therefore, molecular methods have been proposed for the diagnosis of various infectious diseases. Recently, the technique of real time polymerase chain reaction (qPCR) has been developed, presenting as advantages that DNA amplification and detection occurs simultaneously, through a fluorescence system. The study evaluated the performance of the qPCR for specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, in patients with pulmonary tuberculosis. To evaluate the limit of detection, a dilution curve from reference strain of *M. tuberculosis* was performed when the system was able to detect up to 3 bacilli / mL. This threshold is corresponding to the amplification cycle 30, which was used as the maximum limit of positive samples. We evaluated 165 sputum samples from patients suspected of pulmonary tuberculosis, with a sensitivity of 87.9% and specificity of 98% considering the culture and / or response to treatment as the gold standard. The qPCR showed an excellent performance and may be used as an auxiliary tool for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. The diagnosis of TB should be based on joint analysis of various parameters such as smear, culture, clinical picture and therapeutic responses.

AVALIAÇÃO DOS MONÓCITOS ENTRE AS FORMAS CLÍNICAS CRÔNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS ANTES E APÓS ESTÍMULO *in vitro* COM ANTÍGENOS RECOMBINANTES CRA E FRA DE *Trypanosoma cruzi*¹

Ana Karine de Araújo Soares²

As relações entre os monócitos e os linfócitos por meio do MHC de classe II das moléculas coestimulatórias e das citocinas são de extrema importância para a produção de uma resposta imune eficiente. Nesse contexto, propusemo-nos a avaliar a expressão da molécula de superfície HLA-DR⁺ em monócitos CD14⁺ e das moléculas coestimulatórias CD80⁺ e CD86⁺, assim como a produção de citocinas por monócitos CD14⁺ HLA-DR⁺ de portadores de formas clínicas crônicas da DC. A população estudada foi composta por 10 portadores da forma cardíaca sem dilatação (FC1), 14 portadores da forma cardíaca com dilatação (FC2), 7 portadores da forma indeterminada (FI) e 7 indivíduos não infectados (NI) compondo o grupo controle. O sangue total desses indivíduos foi submetido à cultura na presença de CRA ou FRA por 24 horas e analisado por citometria de fluxo. Observamos que o aumento na expressão da molécula coestimulatória CD80⁺ associado à diminuição da expressão de CD86⁺ no grupo FC, quando comparados os contextos *ex vivo* e após estímulo com CRA ou FRA, pode apontar um possível envolvimento desses Ag-Recs com os mecanismos de fuga do hospedeiro utilizados pelo *T. cruzi*. Observamos também correlações positivas semelhantes quando avaliamos a produção de citocinas nos grupos de portadores da FI e FC1, o que indica um controle do parasitismo concomitantemente a uma modulação da resposta. No grupo FC2, constatamos a predominância de uma correlação positiva entre as citocinas inflamatórias, o que sugere um possível predomínio de um perfil do tipo Th1. Apesar disso, esses indivíduos, também apresentaram correlações positivas entre as citocinas IL-12 e IL-10, indicando que possuem mecanismos de regulação. A continuação dos estudos clínicos associados à investigação imunológica da reatividade celular dos pacientes traria maior entendimento dos mecanismos responsáveis pelo aparecimento das manifestações clínicas na fase crônica da DC.

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 Lorena, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, Recife, PE, 2012.

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: anabiom@hotmail.com

ASSESSING OF MONOCYTES AMONG CLINICAL FORMS OF CHRONIC CHAGAS DISEASE BEFORE AND AFTER *in vitro* STIMULATION WITH CRA AND FRA RECOMBINANT ANTIGENS OF *Trypanosoma cruzi*

The relationship between monocytes and lymphocytes by the MHC class II, the co-stimulatory molecules and cytokines, are extremely important for the production of an efficient immune response. In this context we propose to evaluate the expression of cell surface molecule HLA-DR⁺ monocytes CD14⁺, and co-stimulatory molecules CD80⁺ and CD86⁺ and cytokine production by monocytes CD14⁺ HLA-DR⁺ in patients with clinical forms of chronic Chagas disease. The study population consisted of 10 patients with no cardiac dilatation (CF1), 14 patients presented with cardiac dilatation (CF2), 7 patients with the indeterminate form (IF) and 7 uninfected individuals (NI) that compose the control group. Whole blood of these subjects had been cultured in the presence of the CRA or FRA for 24 hours and analyzed by flow cytometry. We observed that the increased expression of the co-stimulatory CD80⁺ molecule was associated with decreased expression of CD86⁺ in the CF group, when compared the contexts *ex vivo* and after stimulation with CRA or FRA, which may indicate a possible involvement of Recs-Ag with the mechanisms of escape from the host used by *T. cruzi*. Also, there was a similar positive correlation when we evaluated the production of cytokines in the groups of patients with IF and the CF1, indicating a control of parasitism, concomitantly with a response modulation. In group CF2 we observed a predominance of a positive correlation between inflammatory cytokines, indicating a possible predominance of a Th1 profile. Nevertheless, these individuals also had positive correlations between IL-12 and IL-10, indicating regulatory mechanisms involved. Further clinical studies associated with the investigation of immune cell reactivity of patients would bring greater understanding of the mechanisms responsible for the onset of clinical manifestations in the chronic phase of Chagas disease.