

Relatório

Área Diagnóstica

janeiro 2010 – maio 2011

Coordenação

Afranio Kritski

Pedro Almeida Silva

Rio de Janeiro, 23 de maio de 2011

Sub- Áreas

1. Imunossorológica:

- Ana Paula Kipnis – UFGO
- Samira Buhner – UFGO
- Walter Oelemann – UFRJ
- Maria Helena Saad – Fiocruz
- Vanete Soccol – UFPR/Tecpar
- Leila Mendonça Lima – Fiocruz
- Martha Oliveira - UFRJ

2. Biologia Molecular:

- Maria Lucia Rossetti – FEPPS-RS
- Philip Noel Suffys / Harrison Magdnier–Fiocruz
- Martha Oliveira – UFRJ

3. Micobacteriologia:

- Moises Palaci – UFES
- Maria Cristina Lourenço –IPEC-Fiocruz
- Leila Fonseca – UFRJ
- Silvana Spindola Miranda - UFMG

4. Imunogenética:

- Martha Oliveira – UFRJ
- Jose Roberto Lapa e Silva – UFRJ
- Milton Moraes /Alexandre Almeida- Fiocruz

5. Outras sub-áreas:

- Pedro Almeida Silva – FURG (desenvolvimento e transferência de tecnologia)
- Afranio Kritski, Reynaldo Dietze e Anete Trajman [capacitação – infra estrutura sites clínicos]
- Sergio Arruda / Theolis Barbosa – Fiocruz-BA
- Afranio Kritski, Jose Seixas, Carmem Maidantchuk, Joao Batista Filho (software – informatização e impacto do escor por meio da Rede Neural)

Portifólio da Área Diagnóstica/INCT-TB Maio de 2011

- Bacfil (manual)
- MLPA
- PCR microplaca
- Plataforma proteômica
- Plataforma lipidômica
- Quimeras protéicas
- BioMarcadores

- Bacfil (4ª versão) automatizado
- Detect TB – kit
- MLPA
- PCR microplaca
- 45 Frações lipídicas
- 5 Quimeras protéicas
- Ag protéicos (Hsp α , Ag85C, MPT51 proteômica)
- 3 Biomarcadores
- Software p/ diag TB pulmonar, pleural e isolamento resp.
- Detect-TB – kit
- Software p/ diag TB pulmonar, pleural e isolamento resp.

- Ensaio pragmático
Avaliar Impacto SUS
- Software: Escore Rede Neural
- Testes comercializados
Diagnóstico
- Detect TB
 - GeneXpert
 - MTBDRplus
 - MGIT960
 - Biometrix /Roche
 - Nitratase
 - Hexagon (sorologia)

Projetos
de
Longo-
Prazo

Projetos
de
Médio-
prazo

Projetos
de
Curto-
prazo

Projetos
de
Médio-
prazo

S

Discovery

LS

LO

Preclinical

Clinical

Access to Patients

PRINCIPAIS RESULTADOS CIENTÍFICOS E/OU TECNOLÓGICOS – JAN 2010 A MAIO 2011

- Desenvolvido e Produzido kit comercial molecular (DETECT-TB) para diagnóstico de TB pulmonar em parceria com empresa privada de Minas Gerais (LABTEST). Submetido a ANVISA para solicitar registro e comercialização
- Padronização da técnica de produção de imunocromatografia (lateral flow), E iniciada fase de produção de testes com antígenos protéicos (descritos na literatura ou novos obtidos por meio de construção plataforma proteômica) ou lipídicos
- Desenvolvido software – prontuário eletrônico a ser utilizado para atendimento do suspeito de TB, TB resistente nas Unidades de Saúde participantes do INCT-TB e com perspectivas de uso no SUS, após validação

PRINCIPAIS IMPACTOS NA AMPLIAÇÃO, MELHORIA E CONSOLIDAÇÃO DA COMPETÊNCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA NACIONAL – JAN 2010 A MAIO 2011

PESQUISA:

•Efetivada interação entre Academia e Indústria Nacional :

- Avaliação dos protótipos na área de imunoserologia desenvolvidos prevista para segundo semestre de 2011 [Univ Goiás]
- Iniciado colaboração Tecpar-Fiocruz – PR para avaliar no protótipo de biomarcadores identificados pela Área diagnóstica.

•Efetivada interação entre Governo, Academia e Sociedade Civil

- Financiamento do MS para avaliar a efetividade e impacto econômico do uso do teste DETECT-TB em 7 Unidades de Saúde de 5 estados do País. Projeto iniciado em março de 2011.
- Interação com Fiocruz e SAS-MS por meio projeto PROQUALIS, onde a TB será incluída como um dos temas chaves do projeto recentemente aprovado (maio 2011)
- Interação com a Rede Brasileira de Avaliação Tecnológica em Saúde – onde o tema TB será discutido no Boletim da BRATS em setembro 2011, com participação da ANVISA, ANS, e Decit

PRINCIPAIS IMPACTOS NA AMPLIAÇÃO, MELHORIA E CONSOLIDAÇÃO DA COMPETÊNCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA NACIONAL – JAN 2010 A MAIO 2011

PESQUISA:

- **Iniciada interação nível internacional**
 - Interação iniciada com Instituto Nacional de Saúde do Ministério da Saúde de Moçambique para avaliação do impacto do uso de novas técnicas diagnósticas. Coordenação do Dr Ilesh Vjani (diretor do INS)
 - Interação iniciada com Instituto de Saúde Pública da Universidade Nova Lisboa – Portugal para estudos conjuntos em Mozambique na avaliação de novas tecnologias

PRINCIPAIS IMPACTOS NA AMPLIAÇÃO, MELHORIA E CONSOLIDAÇÃO DA COMPETÊNCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA NACIONAL – JAN 2010 A MAIO 2011

B – FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS:

- Realização de reuniões científicas quinzenais sobre Pesquisa em TB (principalmente área diagnóstica) promovido pelo Centro de Pesquisa em TB do Programa Acadêmico da TB da Faculdade de Medicina da UFRJ - com divulgação por Telemedicina (www.ufrj.br)
- Realização de cursos capacitação em pesquisa clínica e operacional (qualidade, GCP, GLP) para participantes de projetos conduzidos pela Área Diagnóstica sob a coordenação dos Profs Jose Roberto Lapa e Silva, Martha Oliveira, e Afranio Kritski
- Financiamento previsto do projeto TREAT TB – UNION e Icohrta-NIH para realizar dois cursos capacitação em pesquisa na área diagnóstica em TB para profissionais de saúde de Moçambique, sob a coordenação dos Profs Jose Roberto Lapa e Silva, Antonio Ruffino Netto e Afranio Kritski
- Previsto interação do Programa de Pós-graduação na área da saúde da UFRJ e Programas de Pós-graduação da Fiocruz e Universidade Nova Lisboa e Faculdade de Medicina de Maputo- Moçambique – com ênfase em doenças prevalentes, como a tuberculose

Consolidação de técnicas inovadoras em nível nacional

1. Tipagem molecular de cepas Mtb por sistema automatizado LUMINEX
2. Produção de imunocromatografia (ML-Flow) utilizando antígenos protéicos, lipídicos ou moleculares identificados pelo grupo da Área Diagnostica
3. Padronização da plataforma proteômica para TB na identificação de marcadores sorológicos alternativos à resposta de produção de IFN-g
4. Validação e Produção de novo kit molecular (Detec TB) para o diagnóstico de TB
5. Padronização do teste da Nitratase para o diagnóstico de TB resistente (UFMG e FURG)

Destques para o Desenvolvimento científico, tecnológico e/ou social - II

- 3 pedidos de proteção de propriedade intelectual: **INPI 0900612-5**; outros dois em andamento
- 1 Kit comercial molecular para diagnóstico de TB (Detect TB) produzido, sendo a solicitação do registro junto a ANVISA iniciada e também o processo de avaliação pela CITEC do MS;
- 1 Plataforma de ML-Flow (imunocromatografia) instalada e capacitada para produzir testes
- 1 Plataforma de proteômica para TB na identificação de marcadores sorológicos alternativos à resposta de produção de IFN-g instalada

EDUCAÇÃO E DIVULGAÇÃO DA CIÊNCIA

- Realizado I Seminário Nacional do INCT-TB em novembro de 2009, junto ao Simpósio Nacional de Micobactérias que ocorreu dentro do Congresso Brasileiro de Microbiologia (Porto de Galinhas - Pernambuco). [200 participantes]
- Realizado II Seminário Nacional do INCT-TB em maio de 2010, junto com o IV Encontro Nacional de TB, na cidade do Rio de Janeiro [1400 participantes, 44 convidados estrangeiros]
- Realizado o II Seminário da Área Diagnóstica do INCT-TB em 18 de outubro de 2010, no Rio de Janeiro [15 participantes]

PRINCIPAIS IMPACTOS NA AMPLIAÇÃO, MELHORIA E CONSOLIDAÇÃO DA COMPETÊNCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA NACIONAL – JAN 2010 A MAIO 2011

C – TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO E TECNOLOGIA:

- Convite do MS para participar na elaboração de três projetos de envergadura nacional sobre o impacto de novos testes moleculares e fenotípicos na abordagem diagnóstica de TB e TB resistente com vistas a incorporação de tais testes no sistema público:
- Aprovação da proposta de financiamento da Rede TB encaminhada as três fundações de apoio a pesquisa (Fapeam, Fapemig e Faperj) visando a capacitação de RH e infra-estrutura de sites clínicos nas Unidades de Saúde do SUS, juntamente com as Secretarias Municipais de Saúde, para avaliar o impacto da incorporação de novas tecnologias diagnósticas para TB e posterior incorporação ou não pela CITEC. **Projeto aprovado com cortes em 20 de maio de 2011.**
 - 3 sites para pesquisa clínica e operacional capacitados: RJ (2), Vitoria (1)
 - Prevista de capacitação de 3 sites adicionais no RJ (1), Manaus (1) e Belo Horizonte (1) para viabilizar a validação de novas tecnologias diagnósticas em TB (financiamento da Faperj, Fapeam, e Fapemig)

PRINCIPAIS IMPACTOS NA AMPLIAÇÃO, MELHORIA E CONSOLIDAÇÃO DA COMPETÊNCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA NACIONAL – JAN 2010 A MAIO 2011

C – TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO E TECNOLOGIA:

- **Projeto Validação Clínica Laboratorial do GeneXpert para diagnóstico de TB no Rio de Janeiro e em Manaus** – financiado pela FIND, Liderança da Fiocruz – Dra Valeria Rolla-IPEC, Márcia Pinto-IFF e Afrânio Kritski-Rede TB. Ponto focal da FIND- Mark Perkins- Genebra. do PNCT-SVS- Mauro Sanchez. Financiamento total de U\$ 260.000
- **Projeto GeneXpert para diagnóstico de TB no RJ e Manaus – Roll out (estudo em larga escala)**, Utilizando stepped wedge design – financiado pela Fundação Melinda Gates. Liderança da Dra Betina Durovni-SMS-RJ, Reynaldo Dietze-UFES. Área econômica: Márcia Pinto-IFF-Fiocruz e Rosangela Caetano-UERJ e qualitativa – Kenneth Camargo-UERJ. Ponto focal da Fundação Melinda Gates- Alexandre Menezes, do PNCT-SVS- Mauro Sanchez. Financiamento total de U\$ 800,000
- **Projeto Genexpert vs Fita Hain (MTBDRplus) vs MGIT960 para diagnóstico de TB resistente, no RJ, SP e Ceara**, utilizando *cluster randomized design* – financiado pela UNION. Liderança – Afrânio Kritski-Rede TB, e Claudia Vater – UFRJ, Margareth Dalcolmo – CRPHF-Fiocruz. Ponto focal da UNION- Bertie Squire – Univ Liverpool-UK, do PNCT-SVS- Mauro Sanchez. Financiamento total de R\$ 1.700.000,00.

PRINCIPAIS IMPACTOS NA AMPLIAÇÃO, MELHORIA E CONSOLIDAÇÃO DA COMPETÊNCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA NACIONAL – JAN 2010 A MAIO 2011

D – EDUCAÇÃO E DIVULGAÇÃO DA CIÊNCIA:

1 –Participação efetiva no Steering Committee que coordena as atividades do *Movement Research* da OMS, na elaboração de documento que será divulgado em nível mundial **ao final de 2010** sobre a consolidação de propostas de pesquisa básica aplicada e pesquisa operacional na área de TB, TBHIV e TB-MR, a ser priorizada pelos diversos organismos internacionais

2 - Protagonismo na elaboração do novo Plano Global STOP TB/OMS 2011-2015, na avaliação de desenvolvimento e avaliação de novos testes diagnósticos para TB- texto será publicado em julho 2011

3- Financiamento de 1.600,000,00 (2011-2014) obtido pela SAS-MS para o Projeto PROQUALIS (www.proqualis.net) onde inclui criação de website para divulgar para médicos da atenção primária, as diretrizes clínicas de agravos a saúde prevalentes no país [HAS, DM, INSUF CARDIACA, ASMA, DPOC, E TUBERCULOSE], bem como a avaliação da qualidade das informações contidas nos Guildelines, o cumprimento ou não do AGREE. Projeto sob coordenação do Prof Afranio Kritski (UFRJ) e Dra Claudia Travassos (Fiocruz)

PRINCIPAIS IMPACTOS NA AMPLIAÇÃO, MELHORIA E CONSOLIDAÇÃO DA COMPETÊNCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA NACIONAL – JAN 2010 A MAIO 2011

D – EDUCAÇÃO E DIVULGAÇÃO DA CIÊNCIA:

- *Curso de Treinamento em MIRU-VNTR, Genoscreen, Novembro 2010, Fiocruz, Brasil*
- *Organização do IV Encontro Nacional de Tuberculose, realizado no Rio de Janeiro, em maio de 2011, com a participação de 43 convidados estrangeiros.*
- *Organização do I Workshop Nacional sobre Avaliação do Impacto de Incorporação de Tecnologias em Saúde e Desenvolvimento em Diretrizes-Normas Clínicas – a realizar-se dia 25 de maio de 2011 (financiamento já aprovado pela FAPERJ)*
- *Em paralelo, sob a coordenação do Prof Pedro Almeida da Silva da Universidade do Rio Grande da Área Diagnóstica foi iniciada uma parceria com pesquisadores do Brasil e de outros países da America Latina de educação continuada em doenças infecciosas (ECODI) tendo como piloto um curso sobre TB para profissionais da saúde, utilizando ferramentas de educação a distância (<http://www.ufpel.edu.br/ecodi/>)*

TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO PARA A SOCIEDADE

The image shows a screenshot of the ecodi website. At the top, there is a navigation menu with the following items: Home, Projeto, Curso, Agenda, Links, and Contato. To the right of the menu are icons for search, a hand cursor, and a user profile. The main header features the ecodi logo, which consists of a stylized blue bird-like shape and the text "ecodi" in a bold, lowercase font. Below the logo, it reads "EDUCAÇÃO CONTINUADA EM DOENÇAS INFECCIOSAS". To the right of the header is a photograph of a person wearing a white surgical mask and looking through a microscope. Below the header, there is a horizontal list of country names: Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Equador, Peru, and Venezuela. On the left side, there is a blue map of South America with small icons of the national flags for each of the listed countries. At the bottom left of the map area, the word "Rever" is written. On the right side, there is a blue, abstract, cloud-like shape containing four white icons and their corresponding text: a microscope icon for "Pesquisa em doenças infecciosas", a hand cursor icon for "Ensino à distância", an open book icon for "Educação Continuada", and a person icon for "Profissionais da Saúde".

TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO PARA O SETOR EMPRESARIAL

1. AutoData Industrial Ltda (desenvolvimento do BACFIL com UFES)
2. BTI (padronização do ML-Flow com UFG)
3. BioManguinhos (interação no desenvolvimento de imunocromatografia)
4. **Ampligenix Biotech** e Labtest (produção de teste molecular DETEC TB com FEPPS)
5. LIFEMED (desenvolvimento de testes diagnósticos com FURG)
6. TecPar (desenvolvimento de PPD recombinante com UFPR)

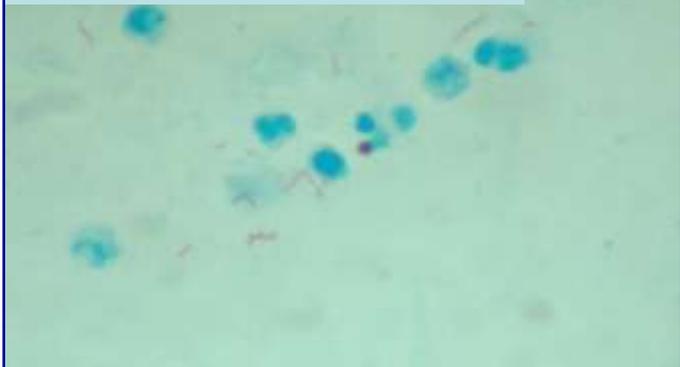
TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO PARA O GOVERNO

- Viabilizado acordo de cooperação entre Academia e Secretaria Municipal de Saúde para provimento de novos testes diagnóstico de TB, TB resistente e tipagem molecular
 - FURG com SMS do Rio Grande e Pelotas
 - UFMG com SMS-BH e Hosp Julia Kubistchek da SES-MG
 - UFRJ e IPEC-Fiocruz com SMS-RJ
 - UFES e SMS-Vitória-ES
 - FEPPS e Hosp Sanatório Parthenon-SES-RS

Desenvolvimento Bacfil (sub-área fenotípica)

1. Resultados abaixo com sistema manual
2. Fase atual - Desenvolvimento do sistema automatizado – 4ª versão
3. Interação da UFES e indústria AutoData Industrial Ltda

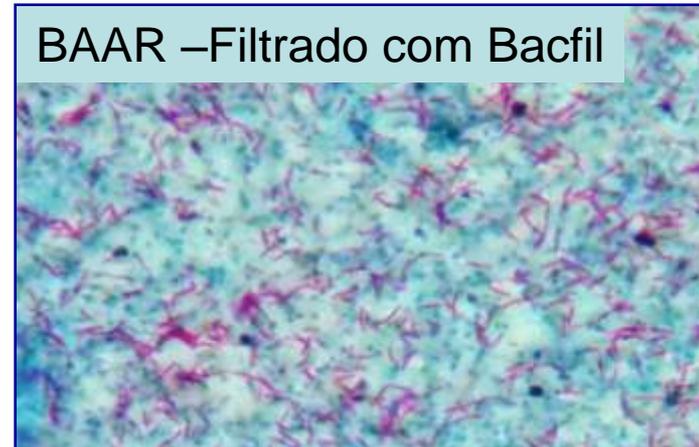
BAAR - Exame Direto



Bacfil



BAAR –Filtrado com Bacfil



ANÁLISE DOS RESULTADOS DAS BACILOSCOPIAS DIRETAS, APÓS CENTRIFUGAÇÃO E APÓS FILTRAÇÃO PELO SISTEMA BACFIL, EM RELAÇÃO AOS RESULTADOS DE CULTURA

Esfregaço	Cultura		Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	VPP	VPN	Índice Kappa
	+	-					
Direto ^{a*}	+	25	59,2% (43,3 – 74,4)	100,0% (97,6 – 100,0)	100%	89,9%	0,69
	-	17					
Centrifugado*	+	56	64,4% (53,4 – 74,3)	100,0% (98,4 – 100,0)	100%	88,1%	0,72
	-	31					
BacFil**	+	79	90,8% (82,7 – 95,9)	100,0% (98,4 – 100,0)	100%	96,6%	0,93
	-	8					

^a Dos 317 pacientes analisados, 193 possuíam exame microscópico direto

* corados pelo método de Auramina O

** corados pelos métodos de Kinyoun e Auramina O

Padronização de Imunocromatografia (sub-área imunoserologia)

1. Controle de qualidade de placas sensibilizadas, sensibilização da membrana de nitrocelulose, Dispensação de antígenos, Dispensação de conjugado de ouro coloidal, Montagem dos *cards* e Empacotamento dos testes.

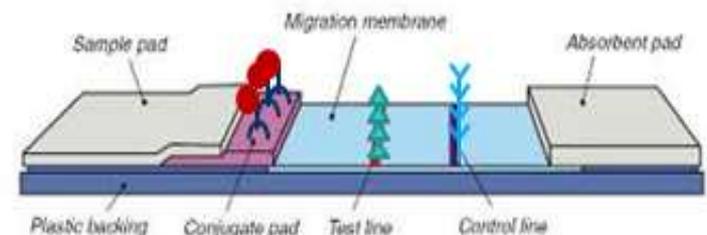
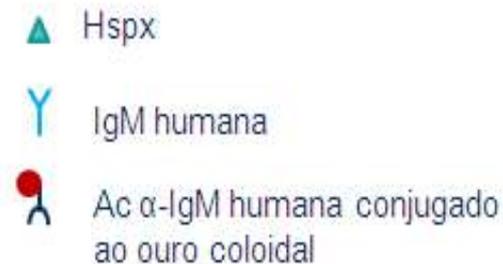
2. Validação dos resultados efetivada ao comparar ML Flow IPTSP/UFG com MLFlow-KIT
Iniciada produção do protótipo Lateral Flow para detecção de IgG específica de antígenos produzidos e purificados por IPTSP: Hsp_x e MPT-51

Tabela: Concordância entre as leituras do teste ML Flow-IPTSP e ML Flow-KIT

		ML Flow KIT		
		Pos	Neg	Total
ML Flow IPTSP	Pos	27	3	30
	Neg	1	169	170
	Total	28	172	200

Valor de kappa: 0,9194 (concordância de 98%)
Desvio Padrão de κ : 0,0706

Figura: Esquema do teste para detecção de anticorpos IgM contra o Hsp_x.

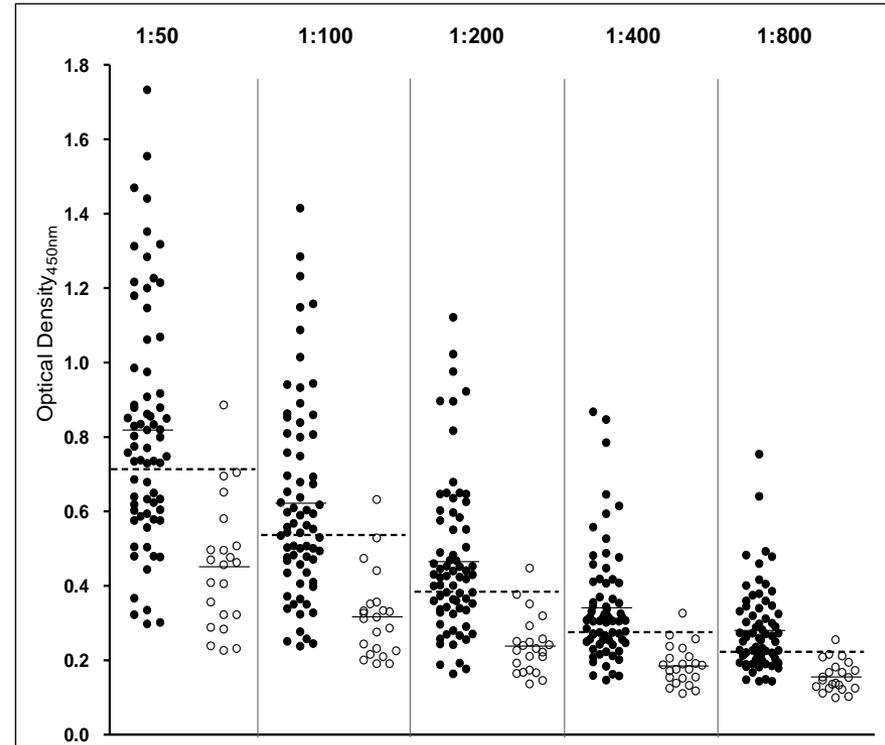
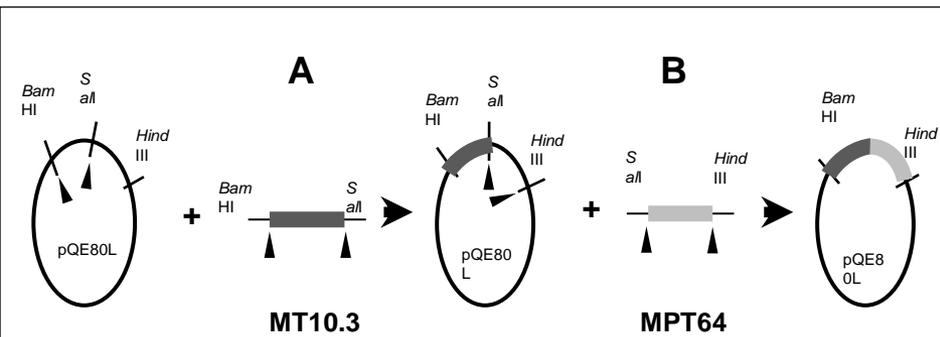


Desenvolvimento Quimeras Proteicas fusionadas (sub-área imunossorologia)

1. Realizada a clonagem, expressão, purificação e caracterização imune de 5 quimeras proteicas fusionadas a partir de genes codificadores de proteínas de *M. tuberculosis*
2. Para o diagnóstico de TB pleural, os melhores resultados foram obtidos com a Quimera FO1 - (MT10.3:MPT64) - com sensibilidade 57/70 (81,4%) e especificidade de 1/22 (95,5%).
3. Previsto o repasse desta quimera para plataforma ML-Flow
4. Previsto produção de monoclonais para pesquisa dos antígenos nos espécimes clínicos.

Esquema da Fusão MT10.3:MPT64

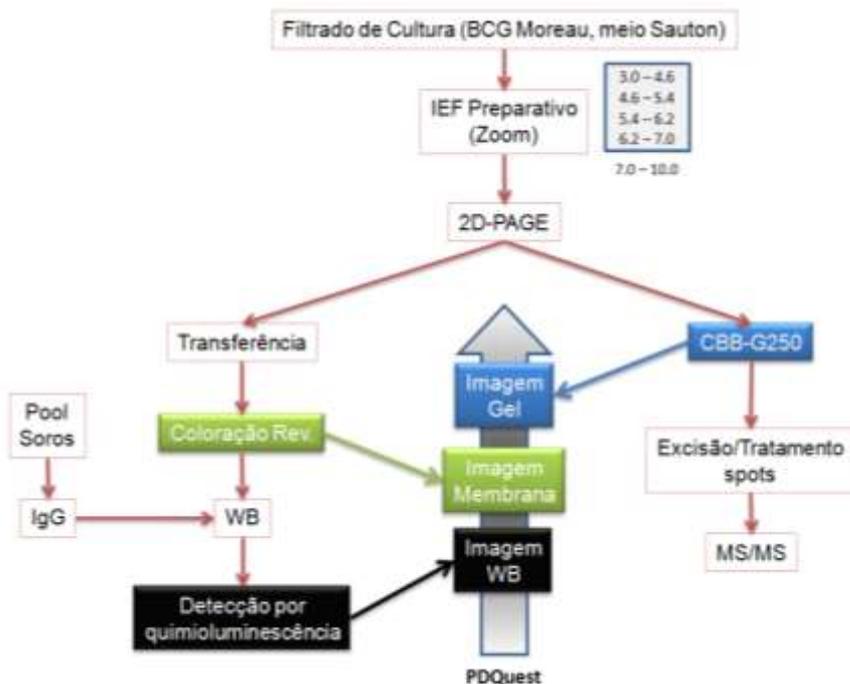
FO1



Distribution of individual humoral responses of the IgA-MT10.3:MPT64 fusion protein in patients with pleural tuberculosis (PL-TB ●) and other pleural diseases (PL-NTBo) tested in serial pleural fluid (PF) dilutions of 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, and 1:800. OD = optical density. Short bar: mean

Desenvolvimento plataforma proteômica (sub-área imunossorologia)

1. Realizada seleção de proteínas de *M. bovis* BCG por uma plataforma proteômica usando coleções de soros de indivíduos de diferentes regiões do Brasil com cepas *M. tb*
2. Avaliado o reconhecimento de antígenos secretados de BCG Moreau por soros de indivíduos saudáveis, revacinados com BCG na idade adulta
3. Produção de 5 proteínas/peptídeos recombinantes identificados na plataforma proteômica
4. Próximo passo avaliar o reconhecimento de antígenos secretados de BCG Moreau por soros de pacientes com TB ativa



	Re-vacinados		Controles
	Alto IFN- γ	Baixo IFN- γ	
T=0 m	<i>Perfil Diferencial WB-2D</i>		
T=2 m			
T=12 m			

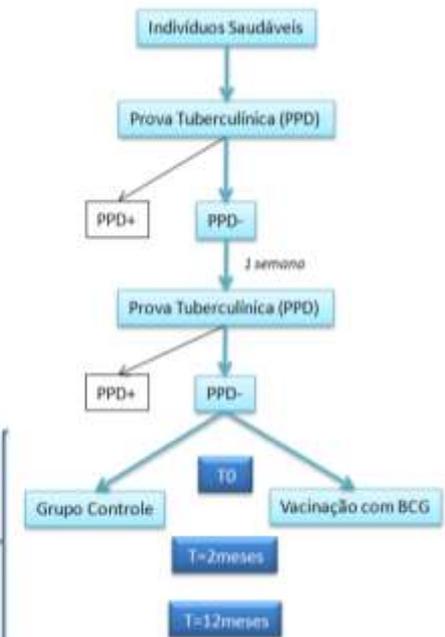


Figura 1: Esquema representando o fluxograma desenvolvido para realização de 2DE-WB

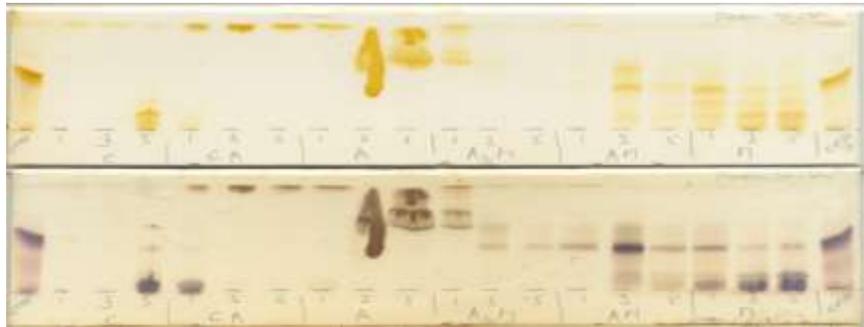
Figura 2: Esquema representando os indivíduos incluídos no estudo de 2DE-WB

Desenvolvimento plataforma lipidômica (sub-área imunoserologia)

1. Realizada caracterização de 45 frações lipídicas de cepas Pasteur, Moreau, M. bovis BCG
2. Avaliado a acurácia de 6 frações lipídicas na sorologia da TB com painéis de soro obtidos nos sites clínicos do INCT-TB (RJ, Goiás, RS) e controles saudáveis
3. Iniciada análise das frações lipídicas /cromatografia gasosa e espectrofotometria massa
4. Realizada clonagem e expressão de antígenos recombinantes com potencial comprovado na literatura para sorologia (ESAT6, CFP10, Tb9.7, Tb16.3, ICD2, PPE55)

Análise das frações por cromatografia em camada fina (TLC)

Exemplo: *single cells* de BCG Moreau /meio Sauton:



- TLC das alíquotas 1, 3 e 5 de cada eluição:
–clorofórmio (C), clorofórmio/acetona 1:1 (CA), acetona (A),
acetona/metanol 3:1 (A₃M), acetona/metanol 1:1 (AM) e metanol (M)
- Revelação dos ácidos graxos por incubação em vapor de iodo
- Revelação de açúcares por orcinol/H₂SO₄

Sobreposição das bandas indica glicolipídios

	Ag 2	Ag 7	Ag 12	Ag 17	Ag 23	Ag 39	
iodo	Painel I (54 TB+; 68 TB-)						
	Sensibilidade [%]	61,1	70,4	57,4	64,8	61,1	61,1
	Specificidade [%]	69,1	51,5	67,6	66,2	51,5	63,2
orcino I	Painel II (71 TB+; 13 TB-)						
	Sensibilidade [%]	70,4*	ND	ND	ND	ND	ND
	Especificidade [%]	92,3 [§]	ND	ND	ND	ND	ND

Tabela: Resposta IgG em 2 painéis de soro, utilizando 6 frações lipídicas

Desenvolvimento, produção de kit molecular e validação clínica e laboratorial (sub-área biologia molecular)

1. Produzido e validado um protótipo de kit molecular para diagnóstico de tuberculose em microplacas em colaboração com uma empresa privada Labtest
2. Iniciado registro na Anvisa, e apresentado o teste ao Decit/Scie/MS (out-2010)→ CITEC
3. Em fase final de desenvolvimento de outro protótipo de kit molecular para diagnóstico de TB multiresistente [PCR multiplex em microplaca]



Fig. kit Detect-TB- Sistema para a detecção de DNA genômico do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

Meta análise revisão Sistemática*	Amostras respiratórias	
	Sens %	Esp %
Teste <i>in house</i> *	84-100	83-100
Teste Amplicor*	90-100 (baar+) 50-96 (baar-)	> 95
EMTD (GenProbe)*	90-100 (baar+) 63-100 (baar-)	> 95
GeneXpert**	98.2% (baar+) 72.5% (baar -)	> 95
DETECT TB*** (estudo fase III – laboratorial) 3 sites: SP, PE, RS, 260 pacientes	93% (baar+) 80% (baar -)	> 95
DETECT TB*** (Estudo fase IV- site no RJ, condições de rotina, 391 suspeitos avaliados)	93% (baar+) 78% (baar-)	> 95

*Flores LL., BMC Microbiol 2005; 5: 55; Ling DI, et al PLoS One 2: e1536, 2008;

* Palomino J; C. FEMS Immunol Med Microbiol (2009) 1–9

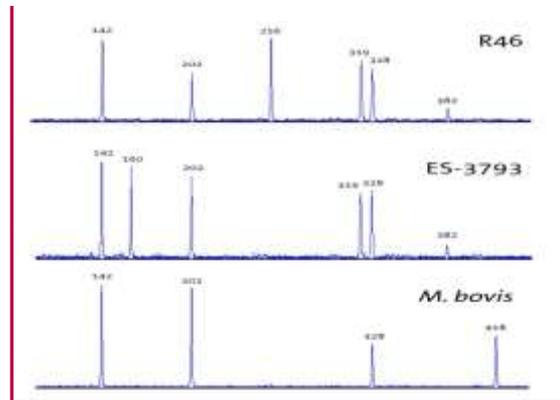
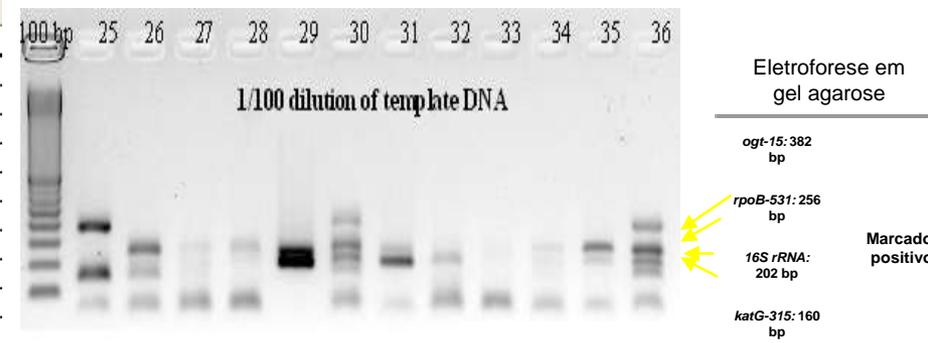
** Artigo recente - Boehme C, et al. 2010, N Engl J Med. 2010 Sep 9;363(11):1005-15

*** Resultados dos estudos do INCT-TB – Área biologia molecular

Desenvolvimento e validação clínica e laboratorial de teste molecular para TB resistente e tipagem molecular (sub-área biologia molecular)

1. Desenvolvido teste *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) com 25 sondas p/ identificar resistência as drogas de 1ª. e 2ª. linha (**RIF, INH, EMB, fluorquinolonas**) e sub-famílias de *M. tuberculosis* (**Beijing, CAS, EAI, LAM, LAM RDRio, Haarlem**). Iniciado validação lab.
2. Sequenciamento – Plataforma PdTis / Fiocruz (fase final)
3. Validação por spoligotyping – por meio de Luminex (automatizado)
4. Próxima etapa validar em amostras clínicas de pacientes suspeitos de TB resistente

	A	B	C
1	probe	length of probe (bp)	target/info
2	embB-306	142	EMB resistance marker
3	katG-315	160	INH resistance marker
4	inhA-15	178	INH resistance marker
5	16S rRNA	202	16S ribosomal RNA gene, MTB-complex specific
6	rpoB-176	229	RIF resistance marker
7	rpoB-531	256	RIF resistance marker
8	rpoB-526G	265	RIF resistance marker
9	rpoB-526T	268	RIF resistance marker
10	rpoB-522	283	RIF resistance marker
11	IS6110	301	insertion element IS <i>6110</i> , MTB-complex specific
12	gyrA-668	310	putative genotype marker, specific for PGG 1 and 2
13	katG-463	319	genotype marker, specific for PGG 2 and 3
14	gyrA-95	328	genotype marker, specific for PGG 1 and 2
15	gyrA-90	337	FQ resistance marker
16	gyrA-90*	338	FQ resistance marker
17	gyrA-94	346	FQ resistance marker
18	mutT2-58	355	genotype marker, specific for Beijing 2
19	ahpC-46	364	genotype marker, specific for CAS1 spoligotype
20	ogt-12	373	genotype marker, specific for Beijing 2
21	ogt-15	382	genotype marker, specific for Haarlem
22	ogt-37	391	genotype marker, specific for Beijing 3 and 4
23	Ag85C-103	409	genotype marker, specific for LAM RD RIO spoligotype
24	TbD1	418	absent in modern MTB strains
25	RD9	430	genotype marker, only present in modern <i>Mt tuberculosis</i>



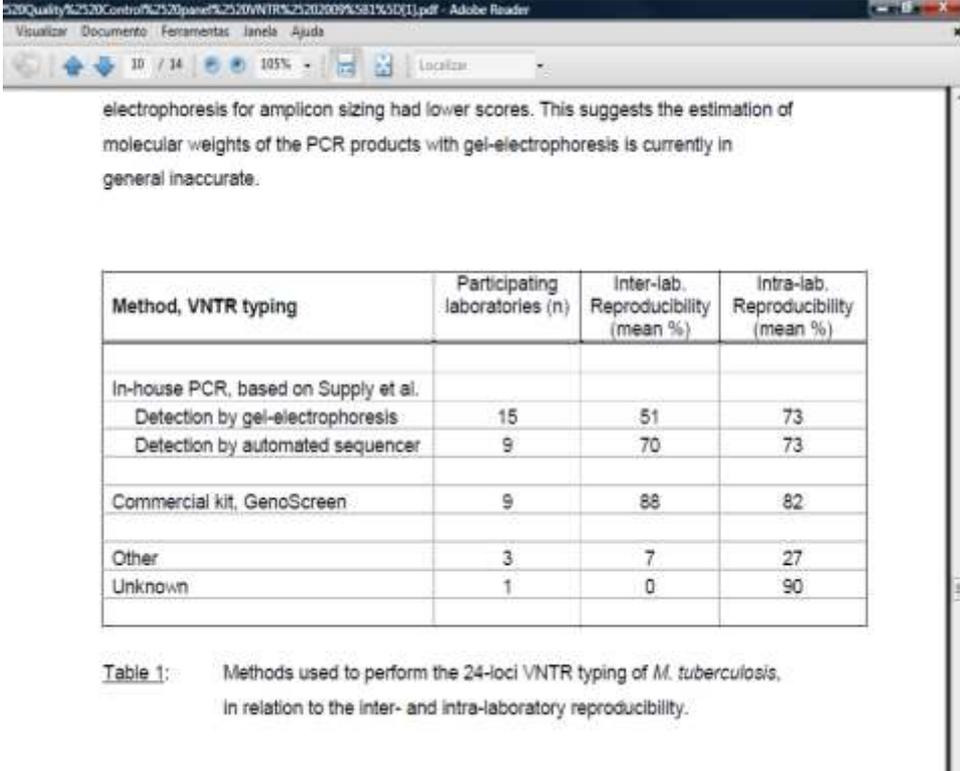
Capillary electrophoresis

Quadro. Descrição das sondas e alvo no MLPA

Validação inter-laboratorial e controle de qualidade de técnicas de tipagem molecular (sub-área biologia molecular)

1. Realizada genotipagem de 2.000 cepas de *M. tuberculosis* isoladas no Brasil, Paraguai, Venezuela e Moçambique por meio das técnicas (RDs, MIRU, RFLP e spoligotyping)
2. Análise de reprodutibilidade da técnica de MIRU por meio de membrana vs automatizado em diferentes laboratórios internacionais

Clade	Total strains	sub-clade	Total strains	sub-clade	Total strains
S	37				
Africanum	3				
Beijing	3				
BOVIS	0	BOV1_variant	8		
CAS1-Delhi	0	CAS1-Delhi_variant	2		
EAI (all sub-clade)	17	EAI6-BGD1_variant	10		
Haarlem (all sub-clade)	242	H1	55	H1-variant	19
		H2	7	H2-variant	0
		H3	108	H3-variant	53
LAM (all sub-clade)	917	LAM1	54	LAM1-variant	30
		LAM2	85	LAM2-variant	18
		LAM3	68	LAM3-variant	32
		LAM4	14	LAM4-variant	34
		LAM5	23	LAM5-variant	19
		LAM6	73	LAM6-variant	49
		LAM9	205	LAM9-variant	116
		other LAM	97		
X (all sub-clade)	93	X1	11	X1_variant	4
		X2	27	X2_variant	29
		X3	18	X3_variant	4
T (all sub-clade)	370	T1	151		
		other T	219		



electrophoresis for amplicon sizing had lower scores. This suggests the estimation of molecular weights of the PCR products with gel-electrophoresis is currently in general inaccurate.

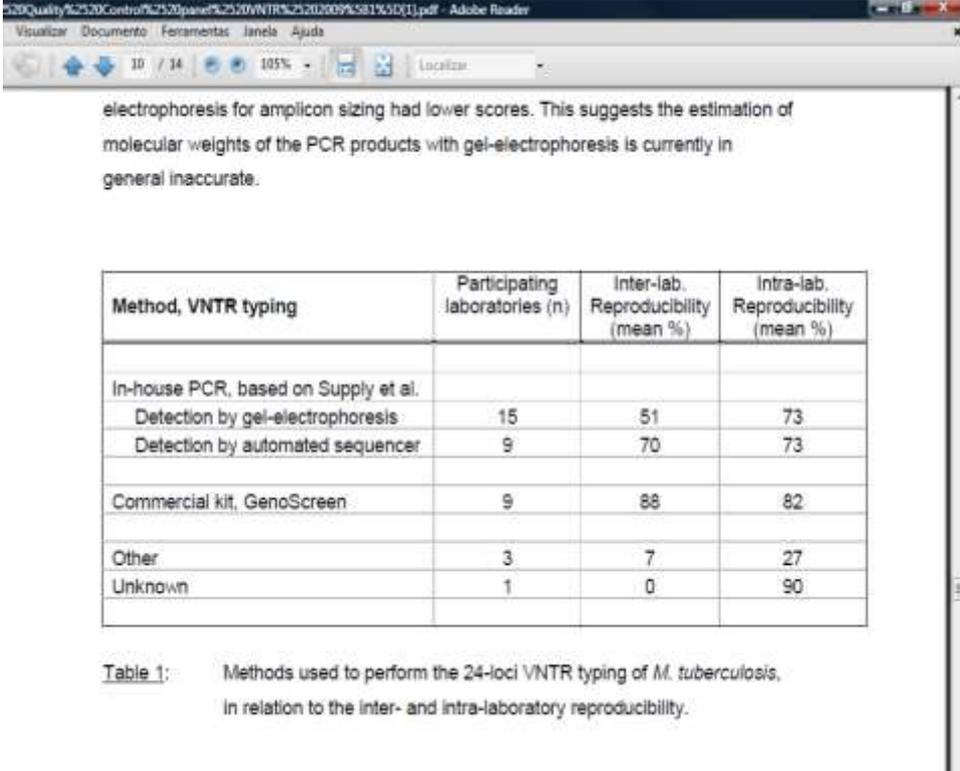
Method, VNTR typing	Participating laboratories (n)	Inter-lab. Reproducibility (mean %)	Intra-lab. Reproducibility (mean %)
In-house PCR, based on Supply et al.			
Detection by gel-electrophoresis	15	51	73
Detection by automated sequencer	9	70	73
Commercial kit, GenoScreen	9	88	82
Other	3	7	27
Unknown	1	0	90

Table 1: Methods used to perform the 24-loci VNTR typing of *M. tuberculosis*, in relation to the inter- and intra-laboratory reproducibility.

Validação inter-laboratorial e controle de qualidade de técnicas de tipagem molecular (sub-área biologia molecular)

1. Realizada genotipagem de 2.000 cepas de *M. tuberculosis* isoladas no Brasil, Paraguai, Venezuela e Moçambique por meio das técnicas (RDs, MIRU, RFLP e spoligotyping)
2. Análise de reprodutibilidade da técnica de MIRU por meio de membrana vs automatizado em diferentes laboratórios internacionais

	Clade	Total strains	sub-clade	Total strains	sub-clade	Total strains
1						
2	S	37				
3	Africanum	3				
4	Beijing	3				
5	BOVIS	0	BOV1_variant	8		
6	CAS1-Delhi	0	CAS1-Delhi_variant	2		
7	EAI (all sub-clade)	17	EAI6-BGD1_variant	10		
8	Haarlem (all sub-clade)	242	H1	55	H1-variant	19
9			H2	7	H2-variant	0
10			H3	108	H3-variant	53
11	LAM (all sub-clade)	917	LAM1	54	LAM1-variant	30
12			LAM2	85	LAM2-variant	18
13			LAM3	68	LAM3-variant	32
14			LAM4	14	LAM4-variant	34
15			LAM5	23	LAM5-variant	19
16			LAM6	73	LAM6-variant	49
17			LAM9	205	LAM9-variant	116
18			other LAM	97		
19	X (all sub-clade)	93	X1	11	X1_variant	4
20			X2	27	X2_variant	29
21			X3	18	X3_variant	4
22	T (all sub-clade)	370	T1	151		
23			other T	219		



electrophoresis for amplicon sizing had lower scores. This suggests the estimation of molecular weights of the PCR products with gel-electrophoresis is currently in general inaccurate.

Method, VNTR typing	Participating laboratories (n)	Inter-lab. Reproducibility (mean %)	Intra-lab. Reproducibility (mean %)
In-house PCR, based on Supply et al.			
Detection by gel-electrophoresis	15	51	73
Detection by automated sequencer	9	70	73
Commercial kit, GenoScreen	9	88	82
Other	3	7	27
Unknown	1	0	90

Table 1: Methods used to perform the 24-loci VNTR typing of *M. tuberculosis*, in relation to the inter- and intra-laboratory reproducibility.

Validação inter-laboratorial e controle de qualidade de técnicas de tipagem molecular (sub-área biologia molecular)

1. Realizado teste de fitness de diferentes cepas de *M. tuberculosis*, famílias Beijing (moderna e ancestral) isoladas de pacientes do Brasil e Moçambique
2. Realizada teste de fitness de diferentes cepas de *M.tuberculosis*, familia RdRio
3. Genotipagem de cepas de Mtb entre casos índices com TB resistente a transmissão para os familiares (Haarlem e Lam)
4. Próxima etapa realizar estudos em modelo animal (UENF e Mexico)

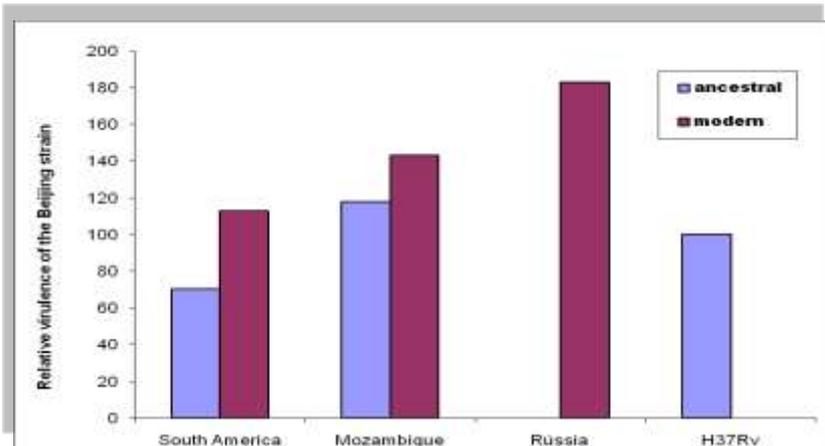


Fig – Virulência de cepas Mtb Beijing, Brasil e Moçambique

Table 3. Comparison of the rate of growth between RD^{Rio} and non-RD^{Rio} lineage members (Analysis 1) and between strains belonging to LAM and non-LAM family (Analysis 2)

	Lineage	No. of samples	Median (h)	95% CI	P
Analysis 1	RD ^{Rio}	17	32.2	27.7–36.8	0.2505
	Non-RD ^{Rio}	23	35.8	31.4–40.2	
Analysis 2	LAM	21	30.8	27.0–34.7	0.0153*
	Non-LAM	19	38.1	33.5–42.7	

*Significant difference of the rate of growth ($P < 0.05$) by t-test.

Fig – Virulência de cepas Mtb RdRio, Lam – Não Lam

Identificação de marcadores imunogenéticos associados a TB doença e TB infecção (sub-área imunogenética)

1. Realizada caracterização de marcadores preditivos ao adoecimento por TB doença e TB infecção em coorte de contatos
2. Realizada a caracterização de marcadores associados a TB disseminada
3. Previsto desenvolver ML-Flow com os marcadores imunogenéticos identificados
4. Previsto validação clínicas e operacional com amostras de pacientes e contatos

Características genotípicas	TB ativa		RR (95% CI)	
	Sim n (%)	Não n (%)	Univariada	Multivariada
TNF- α genotipo				
GG	17 (56.7%)	257 (90.5%)	1.0(reference)	12.3 (4.52-33.5)
GA	5 (16.7%)	22 (7.7%)	2.9 (1.2-7.4)	
AA	8 (26.7%)	5 (1.8%)	9.9 (5.2-18.6)	
A Alelo	0.35	0.05	5.8 (3.7-9.16)	
TLR-2 genotipo				
GG	22 (73.3%)	247 (87%)	1.0 (reference)	3.14 (1.04-9.46)
GA	5 (16.7%)	36 (12.7%)	1.5 (0.60-3.7)	
AA	3 (10%)	1 (0.4%)	9.17 (4.6-18.3)	
A Alelo	0.18	0.06	2.8 (1.4-4.76)	

Quadro 1. Associação de SNPs TNF-alfa e TLR-2 a ocorrência de TB ativa

Característica genotípicas	TB infecção recente		RR (95% CI)	
	Sim n (%)	Não n (%)	Univariada**	Multivariada
TNF- α genotipo				
GG	10 (50%)	90 (85.7%)	1.0 (reference)	8.5 (2.32-31.7)
GA	3 (15%)	11 (10.5%)	2.14 (0.67-6.85)	
AA	7 (35%)	04 (3.8%)	6.36 (3.04-13.32)	
A Alelo	0.42	0.09	4.4(2.62-7.38)	
TLR-2 genotipo				
GG	10 (50%)	89 (84.8%)	1.0 (reference)	10.4 (2.8-38.4)
GA	9 (45%)	14 (13.3%)	3.87 (1.78-8.43)	
AA	1 (5%)	2 (1.9%)	3.3 (0.6-18.15)	
A Alelo	0.27	0.09	2.89 (1.62-5.14)	

Quadro 2 – Associação de SNPs TNF-alfa e TLR-2 a infecção por Mtb

Variáveis	TB grave N=43	TB não grave N=180	Valor de p	OR	IC(95%)
IFN- γ +874					
TT	58(48.7%)	56 (31.6%)	Referência 0.03	4.6	1.09-4.7
TA/AA	61(51.3%)	121(68.4%)			
If (A)	0,69	0,55			

Quadro 3. Associação de SNPs IFN gama com ocorrência de TB grave

Perspectivas e Futuros Desdobramentos - II





OBRIGADO PELA ATENÇÃO

kritskia@gmail.com

www.redetb.org