

**DETECÇÃO RÁPIDA E DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS POR MEIO DE UM SISTEMA DE PCR MULTIPLEX <sup>1</sup>**

*Andrea Santos Lima*

O gênero *Mycobacterium* é constituído por espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e outras denominadas micobactérias não tuberculosas (MNT). Nas infecções causadas por micobactérias, o diagnóstico precoce é essencial para a implementação do tratamento e a cura do paciente. Métodos moleculares têm proporcionado melhoria considerável da velocidade e precisão na identificação das micobactérias. Este estudo teve como objetivo avaliar um sistema PCR Multiplex em diferentes amostras clínicas de pacientes com tuberculose e micobacterioses, além de cepas de micobactérias isoladas em meio de cultura, para ser proposto como ferramenta auxiliar no diagnóstico diferencial da tuberculose e de doenças causadas por MNT. Foram analisados 40 pacientes com diagnóstico de tuberculose realizado pelo médico assistente do serviço de saúde, dos quais 63,1% eram do sexo masculino e 36,9% do feminino. Foram processados 58 espécimes biológicos de origem pulmonar e extrapulmonar. As amostras clínicas pulmonares bacilíferas, extraídas com Kit QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, foram as que amplificaram pelo menos um alvo específico quando foi utilizada a PCR Multiplex. Em relação às características fenotípicas e bioquímicas das 40 cepas de micobactérias, 55% foram caracterizadas como *M. tuberculosis*, 22,5% como micobactérias não tuberculosas. Quando comparamos os resultados dos testes fenotípicos e bioquímicos com a PCR Multiplex, observamos 93,3% de concordância nos resultados. Na comparação dos resultados da PCR Multiplex com a técnica de PRA- hsp65 e com o diagnóstico final dos pacientes, verificamos que houve concordância de 100% e 74,28% dos resultados, respectivamente. Concluímos que a PCR Multiplex poderá ser utilizada como método auxiliar no diagnóstico diferencial da tuberculose e das infecções causadas por MNT. Entretanto, é de fundamental importância que o diagnóstico diferencial seja baseado na análise conjunta de vários parâmetros que identifiquem as espécies de MNT.

---

1 Resumo de dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, sob orientação da Dra. Haiana Charifker Schindler e Co-orientação da Dr<sup>a</sup> Lillian Maria Lapa Montenegro, para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, Recife, Pernambuco, Brasil, 2010.

Endereço para contato: andreasantoslima@hotmail.com

## A RAPID DETECTION AND DIFFERENTIATION OF SPECIES OF MYCOBACTERIA BY MEANS OF A MULTIPLEX PCR SYSTEM.

The genus *Mycobacterium* comprises *Mycobacterium tuberculosis* complex species and nontuberculous mycobacteria (NTM). In infections caused by mycobacteria, early diagnosis is essential for the implementation of treatment and cure. Molecular methods have provided considerable improvement of timing and accuracy in the identification of mycobacteria. This study aimed to evaluate a multiplex PCR system in different clinical samples from patients with tuberculosis and mycobacteria, and mycobacteria strains isolated in culture medium to be proposed as an auxiliary tool in the differential diagnosis of tuberculosis and diseases caused by NTM. We analyzed 40 patients diagnosed with tuberculosis by the attending physician of the health service, 63.1% were males and 36.9% females. Fifty-eight biological specimens of pulmonary and extrapulmonary origin were processed. The clinical samples with positive smear, extracted with Kit QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, amplified at least one specific target when using the multiplex PCR. In relation to phenotypic and biochemical characteristics of 40 strains of mycobacteria, 55.0% were characterized as *M. tuberculosis*, 22.5% as nontuberculous mycobacteria. When comparing the results of phenotypic and biochemical tests with the multiplex PCR, we observed 93.3% agreement in results. Comparing the results of multiplex PCR with the technique of PRA-hsp65 and the final diagnosis of patients, we found that there was agreement in 100.0% and 74.3% of the results, respectively. We conclude that the multiplex PCR could be used as an auxiliary tool in the differential diagnosis of tuberculosis and NTM infections. However it is of fundamental importance that the differential diagnosis is based on joint analysis of various parameters to identify the species of NTM.

# FREQUÊNCIA ALÉLICA DO SISTEMA DE GRUPO SANGUÍNEO DUFFY EM INDIVÍDUOS DE UMA POPULAÇÃO DA AMAZÔNIA E SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO POR *Plasmodium vivax*<sup>1</sup>

Simone Schneider Weber

A interação entre as proteínas do Grupo Sanguíneo Duffy e o *Plasmodium vivax* é necessária para estabelecimento da fase eritrocitária da malária, pois essas moléculas funcionam como receptoras do protozoário. Este estudo mostrou associações significantes entre as variantes Duffy e a susceptibilidade e resistência à malária vivax. No presente estudo, foram determinados os genótipos e fenótipos para o Sistema de Grupo Sanguíneo Duffy em 244 indivíduos residentes em área endêmica de malária no Brasil e realizado exame da gota espessa para pesquisa de plasmódio. Do total de indivíduos pesquisados, 164 eram negativos e 80 positivos para *P. vivax*. Os achados mostram uma elevada frequência do genótipo *FYAFYB* (47,5%), seguido do *FYBFY* (15,6%); *FYAFYA* (14,3%); *FYBFYB* (11,5%); *FYAFY* (8,6%) e com 2,5% o genótipo *FYFY*. A frequência dos alelos *FYA*, *FYB* e *FY* foi 55%, 38,8% e 6,3% em infectados e de 36,3%, 45,1% e 18,6% em negativos, respectivamente. Esses resultados mostram que o alelo *FYA* é mais frequente em infectados, enquanto que o alelo *FYB* aparece em maior quantidade no grupo negativo, mas não significativamente. Portanto, *FYA* confere susceptibilidade e *FYB* não confere proteção à infecção. Entretanto, o alelo *FY* em homozigose não foi encontrado em pacientes com malária, e mostrou um decréscimo na susceptibilidade ou aumento na proteção quando associado com os alelos *FYA* e *FYB*, respectivamente. O genótipo nulo não foi encontrado em infectados, porém esteve presente em 3,7% do grupo negativo. Esses achados sugerem que essas mutações naturais podem ser uma seleção vantajosa conduzindo a mecanismos parciais de defesa contra o *P. vivax* em áreas endêmicas.

## ALLELIC FREQUENCY OF THE DUFFY BLOOD GROUP IN INDIVIDUALS FROM THE AMAZONIAN POPULATION AND THE RELATIONSHIP WITH THE *Plasmodium vivax* INFECTION

The interaction between proteins from the Duffy Blood Group in the human erythrocytes and the *Plasmodium vivax* is necessary for blood stage infections,

---

1 Resumo de dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas (MBT/UEA), sob orientação do Prof. Dr Wanderli Pedro Tadei e Coorientação da Profa Dra Adriana Sotero Martins, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Manaus, Amazonas, Brasil, 2008. E-mail: swbiotecnologia@yahoo.com.br

Endereço para contato: swbiotecnologia@yahoo.com.br

because these molecules act as receptors for this protozoan. This study showed significant associations between Duffy Blood Group variants and susceptibility and resistance to malaria. In the present study, Duffy Blood group genotype and phenotype in 244 individuals living in a Brazilian endemic area and the *P. vivax* identification by thick blood smears were determined. From the total of screened individuals 80 were positive and 164 were negative to *P. vivax*. Our results showed a high frequency of genotypes *FYAFYB* (47.5%), followed by *FYBFY* (15.6%), *FYAFYA* (14.3%), *FYBFYB* (11.5%), *FYAFY* (8.6%), and 2.5% with *FYFY*. The frequency of *FYA*, *FYB* and *FY* alleles was 55.0%, 38.8% and 6.3% in infected patients and, in the group tested negative, 36.3%, 45.1% and 18.6%, respectively. These results demonstrated that *FYA* allele is significantly more frequent in infected individuals, while the *FYB* appeared in higher quantity in the malaria group, but not significantly. Therefore, *FYA* in homozygosis suggests susceptibility and *FYB* does not give protection to infection. On the other hand, *FY* allele in homozygosis was not found among the infected patients, and showed a decrease in the susceptibility or increase in the protection when associated with *FYA* and *FYB* alleles, respectively. The null genotype was not found in the infected subjects; however it occurred in 3.7% in the group tested negative. These findings suggest that natural mutations could still be an advantageous selection leading to partial defense mechanisms against *P. vivax* in the endemic area.

# ASSOCIAÇÃO ENTRE AS FORMAS CLÍNICAS CRÔNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS E OS NÍVEIS SÉRICOS DE IMUNOGLOBULINA A (IgA) FRENTE AOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES CRA E FRA DE *Trypanosoma cruzi*<sup>1</sup>

Romero Henrique Teixeira Vasconcelos

A doença de Chagas é uma enfermidade largamente distribuída pelo continente americano, onde afeta milhões de indivíduos e apresenta relevantes implicações médicas, sociais e econômicas. Clinicamente, a doença apresenta uma diversidade de manifestações; na fase crônica, os indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* podem ser assintomáticos ou podem apresentar complicações cardíacas e/ou digestivas. Alguns estudos têm demonstrado o envolvimento da resposta imune no desenvolvimento e manutenção das formas clínicas crônicas da infecção chagásica. A resposta a isotipos específicos tem sido associada às diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas. Com o objetivo de estabelecer um perfil isotípico capaz de diferenciar as formas clínicas da doença de Chagas, este estudo se propôs a investigar os níveis séricos de IgA no soro de pacientes chagásicos frente a dois antígenos recombinantes do *T. cruzi*. Para isso, foram coletadas amostras de soro de 96 pacientes chagásicos selecionados no Hospital Universitário Oswaldo Cruz. Também foram coletadas amostras de soro de 14 indivíduos saudáveis para estabelecimento do *cut-off*. Para detecção da IgA, placas de ELISA foram sensibilizadas com os antígenos recombinantes CRA ou FRA de *T. cruzi*. As amostras de soro foram depositadas em duplicata nos poços e a ligação dos anticorpos específicos foi detectada por meio do complexo biotina-estreptavidina-peroxidase. Os resultados foram expressos na forma de índices de reatividade. Verificou-se que os pacientes chagásicos apresentaram níveis séricos variados de IgA frente aos antígenos CRA e FRA. Entretanto, este isotipo específico para os dois antígenos recombinantes foi capaz de distinguir os pacientes chagásicos portadores das formas digestiva e mista, pelos seus níveis séricos elevados, daqueles portadores das formas indeterminada e cardíaca. Ao avaliar o desempenho deste teste, observou-se que ele apresenta elevada especificidade e elevado valor preditivo positivo, podendo ser utilizado, após confirmação destes resultados em um estudo prospectivo, como um marcador de evolução clínica para as manifestações digestivas da doença de Chagas. A investigação de alterações precoces no sistema digestivo com marcadores séricos pode ser um recurso auxiliar para os médicos no acompanhamento e redirecionamento das condutas terapêuticas de pacientes chagásicos crônicos.

---

1 Resumo de Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz, sob orientação das professoras Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes e Dra. Yara de Miranda Gomes, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Recife, PE, 2009.

Endereço para contato: meroricky@cpqam.fiocruz.br

## ASSOCIATION BETWEEN THE CHRONIC CLINICAL FORMS OF CHAGAS DISEASE AND SERUM LEVELS OF IMMUNOGLOBULINA (IgA) AGAINST THE CRA AND FRA RECOMBINANT ANTIGENS OF *Trypanosoma cruzi*

Chagas disease is widely distributed throughout the American continent, where affects millions of individuals and presents significant medical, social and economic implications. Clinically, the disease presents a variety of manifestations. In the chronic phase of the disease, the individuals infected with *Trypanosoma cruzi* may have no symptoms or may present cardiac and/or digestive manifestations. Several studies demonstrated the involvement of the immune response in the development and maintenance of chronic clinical forms of Chagas disease. It is known that the response to specific isotypes has been associated to different clinical manifestations of Chagas disease. The aim of this study was to investigate whether serum levels of IgA in serum of chagasic patients against two recombinant antigens of *T. cruzi* were able to establish an isotype profile which could differentiate the clinical forms of Chagas disease. Serum samples from 96 chagasic patients selected at the Oswaldo Cruz University Hospital were collected. Serum samples from 14 healthy individuals were also collected to establish the cut-off point. In order to detect IgA, wells of ELISA plates were coated with the antigens CRA or FRA of *T. cruzi*. Serum samples were added in duplicate to each well and specific binding was detected using the biotin-streptavidin-peroxidase complex. The results were expressed in the form of a reactivity index. It was observed that chagasic patients had varying levels of IgA against the CRA and FRA antigens. However, this specific isotype for both recombinant antigens was able to differentiate patients with digestive and cardio-digestive forms of Chagas disease, by their elevated serum levels, from those with the indeterminate and cardiac forms. The diagnostic performance of this test showed high specificity and high positive predictive values, therefore, after confirmation of these findings in a prospective study; it may be used as an immunological marker for the digestive involvement of Chagas disease. The investigation of early alterations in the digestive system using serum markers could improve management and treatment of chronic chagasic patients.