

Rodrigo Ivan Prim

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE TESTES  
LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE  
EM AMOSTRAS CLÍNICAS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO – HU/UFSC E  
DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE UM TESTE DE  
PCR QUANTITATIVO PARA DETECÇÃO DE *Mycobacterium  
tuberculosis***

Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutor em Farmácia na área de  
concentração Análises Clínicas  
Orientador: Profa. Dra. Maria Luiza  
Bazzo

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

PRIM, RODRIGO IVAN

Epidemiologia molecular e avaliação de testes laboratoriais para diagnóstico da tuberculose em amostras clínicas do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago - HU/UFSC e desenvolvimento e otimização de um teste de PCR quantitativo para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* / RODRIGO IVAN PRIM ; orientadora, Maria Luiza Bazzo, 2018. 181 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Tuberculose. 3. Baciloscopia. 4. Cultura. 5. Xpert MTB/RIF. I. Bazzo, Maria Luiza. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE TESTES  
LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE  
EM AMOSTRAS CLÍNICAS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO – HU/UFSC E  
DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE UM TESTE DE  
PCR QUANTITATIVO PARA DETECÇÃO DE *Mycobacterium  
tuberculosis***

**POR**

**Rodrigo Ivan Prim**

**Tese julgada e aprovada em sua  
forma final pelo(a) Orientador(a) e  
membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores Doutores:**

**Banca Examinadora:**

---

**Prof(a). Dr(a). Thaís Cristine Marques Sincero (UFSC – Membro  
Titular)**

---

**Prof(a). Dr(a). Eduardo Monguilhott Dalmarco (UFSC – Membro  
Titular)**

---

**Prof(a). Dr(a). Jussara Kasuko Palmeiro (UFPR – Membro  
Titular)**

---

**Prof(a). Dr(a). Maria Luiza Bazzo (UFSC – Orientador)**

**Prof(a) Dr(a). Elenara Maria Teixeira Lemos Senna**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

**Florianópolis, 13 de agosto de 2018.**







## AGRADECIMENTOS

À Professora Maria Luiza Bazzo pela oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional, ensinamentos compartilhados e pela convivência harmoniosa durante todos esses anos em que fui seu orientando.

Aos colegas Felipe, Lica, Letícia, Marcos, Eduardo, Mara, Taiane, Mirela e aos demais integrantes do LBMMS.

Ao Fernando e à Manoela, alunos do LBMMS, pela importante ajuda nos experimentos da etapa final do trabalho

À professora Maria Cláudia Santos Silva e aos demais funcionários da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas (LACL) do Hospital Universitário/UFSC, em especial ao Márcio, à Mara, ao Luiz, ao Rodrigo e à Maria Luiza, funcionários do Setor de Microbiologia

À Cida, sempre disposta a colaborar com todos e que prestou grande auxílio na execução do estudo

Às professoras da disciplina de Microbiologia Clínica Thaís Sincero, Helena Cristina Ferreira Franz e Lucy Maria Bez Birolo pelos ensinamentos e trocas de experiências durante o período em que fiz estágio de docência e fui professor substituto

À Clarice, minha querida esposa que teve participação fundamental na realização deste trabalho, não só compreendendo os períodos de ausência e me incentivando, mas também participando ativamente em algumas etapas deste estudo

Aos meus pais, Maria Zenaide e José Humberto, por sempre me incentivarem a estudar e pelo amor e dedicação; aos meus irmãos Andressa e Rafael e a todos os demais familiares

À Darcita Büerger Rovaris e à Luciane Lima, bioquímicas do Setor de Tuberculose do LACEN/SC, instituição que é responsável pela coordenação da Rede de TRM-TB em Santa Catarina.

À UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia e seus professores, pelo conhecimento e formação.

Em uma caminhada longa, inúmeras pessoas tiveram participação importante, mesmo que aparentemente simplória, na realização deste trabalho. Sou imensamente grato a todos que contribuíram de alguma forma.



## RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A cultura é o método padrão-ouro no diagnóstico laboratorial de TB, mas o resultado é obtido em até oito semanas em meio de cultura sólido e em até seis semanas em meio de cultura líquido. A baciloscopia apresenta resultado rápido, porém sua sensibilidade é baixa, especialmente na TB extrapulmonar. Uma boa alternativa é a utilização de testes moleculares, como por exemplo, o teste Xpert® MTB/RIF. Além disso, é importante o desenvolvimento de metodologias in house, que tornam o custo mais acessível. Este trabalho foi dividido em três capítulos experimentais (CE), sendo o CE-I um estudo descritivo retrospectivo para avaliação do teste Xpert® MTB/RIF em amostras de rotina do Hospital Universitário da UFSC, o CE-II um estudo descritivo prospectivo analisando os dados clínicos e epidemiológicos dos participantes, bem como a avaliação do teste Xpert® MTB/RIF em reação à cultura sólida e líquida e aplicação de metodologias de epidemiologia molecular diretamente de restos de reação do teste Xpert® MTB/RIF e o CE-III o desenvolvimento e a otimização de uma qPCR para diagnóstico da TB utilizando sondas de hidrólise. Na cultura líquida e na cultura sólida houve o crescimento de 17/19 e 18/19 amostras pulmonares e 3/4 e 4/4 amostras extrapulmonares de pacientes com TB. A tosse por mais de duas semanas, a perda de peso, a sudorese noturna e o contato prévio com pessoas com TB foram significativamente mais presentes em participantes com TB pulmonar (cultura positiva) do que em participantes sem TB pulmonar (cultura negativa). A sensibilidade da baciloscopia nas amostras pulmonares variou entre 70 e 80%, exceto para os participantes com TB prévia, onde foi obtido 100% de sensibilidade. Em amostras extrapulmonares a sensibilidade da baciloscopia foi baixa. Já o teste Xpert® MTB/RIF teve sensibilidade e especificidade acima de 95% em amostras pulmonares. Apesar da alta especificidade, a sensibilidade em amostras extrapulmonares do teste Xpert® MTB/RIF ficou próxima a 40%. Foi possível obter os perfis do MIRU-15 a partir do DNA genômico presente nos restos de reação em amostras que amplificaram no Xpert® MTB/RIF com Cq menor ou igual a 24, mas os perfis do spoligotyping foram obtidos com sucesso somente a partir do isolado clínico. A qPCR in house desenvolvido apresentou ótima performance analítica, especialmente nos limites de

detecção, que foram de 4,7 cópias, 11,8 cópias e 23,6 cópias por reação, respectivamente para os alvos IS6110, IS1081 e *senX3*.

**Palavras-chave:** Tuberculose. Baciloscopia. Cultura. Xpert® MTB/RIF. qPCR *in house*.

## ABSTRACT

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND EVALUATION OF LABORATORY TESTS TO TUBERCULOSIS DIAGNOSIS IN CLINICAL SAMPLES FROM UNIVERSITY HOSPITAL POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO – HU/UFSC AND DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF A QUANTITATIVE PCR TEST TO DETECT *Mycobacterium tuberculosis*

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Culture is the gold standard method for laboratory diagnosis of TB, but it can take up to 8 weeks in solid medium and up to 6 weeks in liquid medium. Smear microscopy is a fast method, but its sensitivity is low, especially in extrapulmonary TB. A good alternative is the use of molecular tests, such as Xpert® MTB/RIF test. In addition, it is important to develop in-house methodologies that make the cost more affordable. This study was divided in three experimental chapters (CE): CE-I is a retrospective descriptive study for evaluation of the Xpert® MTB/RIF test in routine samples of the University Hospital of UFSC, CE-II is a prospective descriptive study that analyzes the clinical and epidemiological data of the participants, as well as the evaluation of the Xpert® MTB/RIF test in response to solid and liquid culture and application of molecular epidemiology methodologies directly to the reaction residues of Xpert® MTB/RIF test, and CE-III which shows the development and optimization of qPCR for diagnosis of TB using hydrolysis probes. In liquid and solid culture there was growth of 17/19 and 18/19 pulmonary samples and 3/4 and 4/4 extrapulmonary samples of patients with TB. Coughing for more than two weeks, weight loss, night sweats and previous contact with people with TB were significantly more prevalent in participants with pulmonary TB (positive culture) than in participants without pulmonary TB (negative culture). The sensitivity of the smear microscopy in pulmonary samples varied between 70 and 80%, except for the participants with previous TB, where 100% of sensitivity was obtained. The sensitivity of the smear microscopy was low in extrapulmonary samples. However, Xpert® MTB/RIF test had sensitivity and specificity above 95% in pulmonary samples. Despite the high specificity, sensitivity in extrapulmonary samples was close to 40% for Xpert® MTB/RIF test. It was possible to obtain MIRU-15 profiles from the genomic DNA present in the reaction residues in samples that amplified on Xpert® MTB/RIF with Cq less than or equal to 24, but the

spoligotyping profiles were only successfully obtained from clinical isolate. The developed in-house qPCR presented excellent analytical performance, especially at detection limits, which were 4.7 copies, 11.8 copies and 23.6 copies per reaction, respectively for IS6110, IS1081 and *senX3* targets.

**Keywords:** Tuberculosis. Smear microscopy. Culture. Xpert® MTB/RIF. qPCR in house.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Indicadores mundiais do número de casos e de mortes estimados de TB entre os anos de 1990 e 2012.....	33
<b>Figura 2</b> - Equipamentos GeneXpert (Cepheid). A: Computador Notebook (pode ser adquirido com desktop também). B: GeneXpert I; C: GeneXpert II; D: GeneXpert IV; E: GeneXpert Omni (point-of-care); F: GeneXpert XVI and G: GeneXpert Infinity.....	50
<b>Figura 3</b> - Fluxograma interno do software para avaliar os resultados do Xpert® MTB/RIF.....	53
<b>Figura 4</b> - Fluxo das amostras pulmonares e extrapulmonares no CP-I58	
<b>Figura 5</b> - Fluxograma das amostras pulmonares e extrapulmonares recebidas durante o período do estudo no LACL-HU.....	65
<b>Figura 6</b> - Processamento das amostras pulmonares (A) e extrapulmonares (B) recebidas no estudo.....	79
<b>Figura 7</b> - Relação entre a carga bacilar (Cq) e o sucesso nas amplificações do MIRU-15 com o DNA obtido diretamente do cartucho do teste Xpert® MTB/RIF .....	104
<b>Figura 8</b> - Resultados de spoligotyping realizado a partir dos restos do teste Xpert® MTB/RIF da amostra clínica (A) e a partir do DNA extraído após cultura do isolado clínico (B). A flecha vermelha indica o perfil de um controle positivo ( <i>M. bovis</i> ). .....	108
<b>Figura 9</b> - Análise combinada de MIRU-15 e spoligotyping utilizando o dendrograma de similaridade UPGMA.....	110
<b>Figura 10</b> - Estratégia de detecção de CMTB por qPCR demonstrando os iniciadores e sondas utilizados.....	115
<b>Figura 11</b> - Amplificação a cada ciclo da qPCR IS6110-CIA para detecção de <i>M. tuberculosis</i> do pool de amostras e da suspensão de bactérias com extração por quatro protocolos diferentes (A, B, C e D) .....	121
<b>Figura 12</b> - Média das fluorescências da qPCR para otimização da concentração dos iniciadores das reações individuais. (A) reação IS6110, detecção da sonda IS6110 (FAM); (B) reação CIA, (ROX); (C) reação IS1081, (JOE) e (D) reação <i>senX3</i> (FAM).....	125
<b>Figura 13</b> - Média das fluorescências da qPCR para otimização da concentração dos iniciadores das reações individuais e combinadas. (A) reação IS6110-CIA, detecção da sonda IS6110 (FAM); (B) reação IS6110-CIA, detecção da sonda CtPC (ROX); (C) reação IS1081-	

senX3, detecção da sonda IS1081 (JOE) e (D) reação IS1081-senX3, detecção da sonda senX3 (FAM). ..... 127

**Figura 14** - Média das fluorescências da qPCR para otimização das sondas em reações combinadas. (A) reação IS6110-CIA, detecção da sonda IS6110 (FAM); (B) reação IS6110-CIA, detecção da sonda CtPC (ROX); (C) reação IS1081-senX3, detecção da sonda IS1081 (JOE) e (D) reação IS1081-senX3, detecção da sonda senX3 (FAM). ..... 129

**Figura 15** - Média das fluorescências da qPCR para otimização da temperatura de anelamento em reações combinadas. (A) reação IS6110-CIA, detecção da sonda IS6110 (FAM); (B) reação IS6110-CIA, detecção da sonda CtPC (ROX); (C) reação IS1081-senX3, detecção da sonda IS1081 (JOE) e (D) reação IS1081-senX3, detecção da sonda senX3 (FAM). ..... 131

**Figura 16** - Eficiência dos iniciadores IS6110 na reação IS6110-CIA com DNA de Mtb diluído em tampão TE (A e B) e diluído em pool de DNA extraído de amostras pulmonares e extrapulmonares (C e D). .. 132

**Figura 17:** Eficiência dos iniciadores IS1081 na reação IS1081-senX3 com DNA de Mtb diluído em tampão TE (A e B) e diluído em pool de DNA extraído de amostras pulmonares e extrapulmonares (C e D) e eficiência dos iniciadores senX3 em DNA em tampão TE (E e F) e pool de DNA (G e H) ..... 133

**Figura 18** - Eficiência dos iniciadores IS6110 na reação CIA com o oligonucleotídeo C+CtPC diluído em tampão TE. ..... 134

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Interpretação do resultado semiquantitativo de acordo com a média dos C <sub>q</sub> de detecção das sondas positivas.....	60
<b>Quadro 2</b> - Interpretação dos resultados da cultura conforme o crescimento das colônias.....	61
<b>Quadro 3</b> - Interpretação do resultado da baciloscopia conforme o número de bacilos observados.....	63
<b>Quadro 4</b> - Etapas realizadas nos protocolos de extração de DNA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a partir de amostras clínicas.....	114





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Iniciadores e sondas utilizados no teste Xpert® MTB/RIF. Na coluna das sequências, as letras em minúsculo indicam homologia com o DNA de <i>M. tuberculosis</i> , enquanto as letras em maiúsculo indicam a complementariedade para formação da haste da sonda do tipo <i>molecular beacon</i> .....	52
<b>Tabela 2</b> - Amostras pulmonares com resultados válidos na cultura, Xpert® MTB/RIF e baciloscopia incluídas no CE-I.....	66
<b>Tabela 3</b> - Sensibilidade e especificidade clínicas da baciloscopia em amostras pulmonares recebidas no CE-I utilizando como padrão-ouro a cultura.....	67
<b>Tabela 4</b> - Sensibilidade e especificidade clínicas do teste Xpert® MTB/RIF em amostras pulmonares no CE-I utilizando como padrão-ouro a cultura.....	68
<b>Tabela 5</b> - Sensibilidade e especificidade clínicas do teste Xpert® MTB/RIF de acordo com o perfil da baciloscopia das amostras pulmonares incluídas no CE-I.....	68
<b>Tabela 6</b> - Sensibilidade clínica do Xpert® MTB/RIF e da baciloscopia de acordo com o número de cruzes da cultura das amostras pulmonares incluídas no CE-I.....	69
<b>Tabela 7</b> - Valor Preditivo Positivo (VPP) do teste Xpert® MTB/RIF e detecção da baciloscopia de acordo com o resultado semiquantitativo das amostras pulmonares incluídas no CE-I.....	70
<b>Tabela 8</b> - Amostras extrapulmonares com resultados válidos na cultura, Xpert® MTB/RIF e baciloscopia incluídas no CE-I.....	71
<b>Tabela 9</b> - Sensibilidade e especificidade clínicas da baciloscopia em amostras extrapulmonares incluídas no CE-I utilizando como padrão-ouro a cultura.....	72
<b>Tabela 10</b> - Sensibilidade e especificidade clínicas do teste Xpert® MTB/RIF em amostras extrapulmonares incluídas no CE-I utilizando como padrão-ouro a cultura.....	73
<b>Tabela 11</b> - Sensibilidade clínica em amostras acordo com o número de cruzes da cultura extrapulmonares incluídas no CE-I da baciloscopia e do Xpert® MTB/RIF de acordo com o número de cruzes da cultura ....	74
<b>Tabela 12</b> - Valor Preditivo Positivo em amostras extrapulmonares incluídas no CE-I do teste Xpert® MTB/RIF de acordo com o resultado semiquantitativo da metodologia.....	74

<b>Tabela 13</b> - Resultados de sensibilidade e especificidade da utilização do Xpert® MTB/RIF na detecção de resistência à rifampicina em relação ao TSA no CE-I. ....	75
<b>Tabela 14</b> - Relação dos iniciadores forward e reverse que foram utilizados na reação de PCR do MIRU-15.....	85
<b>Tabela 15</b> - Relação entre o tamanho do produto amplificado e o número de repetições de cada locus.....	86
<b>Tabela 16</b> - Comparação da descontaminação pelo método de Ogawa-Kudoh (O-K) e pelo método do NALC-NaOH e meio sólido Lowenstein-Jensen (L-J) com resultado positivo.....	89
<b>Tabela 17</b> - Resultados da comparação entre cultura líquida manual utilizando o meio Middlebrook 7H9-OADC-PANTA e cultura sólida utilizando os meios Ogawa-Kudoh ou Lowenstein-Jensen em amostras recebidas entre maio de 2017 e maio de 2018 .....	90
<b>Tabela 18</b> - Características clínico-epidemiológicas dos pacientes incluídos no CP-II.....	92
<b>Tabela 19</b> - Características dos pacientes incluídos no CE-II com diferenças estatisticamente significativas. ....	93
<b>Tabela 20</b> - Amostras pulmonares com resultados válidos na cultura (positivo ou negativo) e incluídas no CP-II. ....	94
<b>Tabela 21</b> - Comparação da sensibilidade e especificidades clínicas da baciloscopia em amostras pulmonares obtidas de participantes sem histórico de tuberculose incluídos no CP-II.....	95
<b>Tabela 22</b> - Comparação da sensibilidade e especificidades clínicas do teste Xpert® MTB/RIF em amostras pulmonares obtidas de participantes sem histórico de tuberculose incluídos no CP-II.....	96
<b>Tabela 23</b> - Comparação da sensibilidade e especificidade clínicas da baciloscopia em amostras obtidas espontaneamente ou por broncoscopia de participantes com tuberculose prévia incluídos no CP-II.....	97
<b>Tabela 24</b> - Comparação da sensibilidade e especificidades clínicas do teste Xpert® MTB/RIF em amostras obtidas espontaneamente ou por broncoscopia de participantes com tuberculose prévia incluídos no CP-II .....	98
<b>Tabela 25</b> - Sensibilidade clínica do Xpert® MTB/RIF e da baciloscopia de acordo com o número de cruzes da cultura das amostras pulmonares incluídas no CP-II .....	98

<b>Tabela 26</b> - Amostras extrapulmonares com resultados válidos na cultura (positivo ou negativo) e incluídas no CP-II.....	99
<b>Tabela 27</b> - Sensibilidade e especificidade clínicas da baciloscopia em amostras extrapulmonares incluídas no CP-II.....	100
<b>Tabela 28</b> - Sensibilidade e especificidade clínicas do teste Xpert® MTB/RIF em amostras extrapulmonares incluídas no CP-II.....	101
<b>Tabela 29</b> - Sensibilidade clínica da baciloscopia e do Xpert® MTB/RIF em amostras extrapulmonares incluídas no CP-II de acordo com o número de cruces da cultura .....	102
<b>Tabela 30</b> - Resultados de sensibilidade e especificidade clínicas do teste Xpert® MTB/RIF na detecção de resistência à rifampicina em relação ao TSA em amostras extrapulmonares incluídas no CP-II .....	103
<b>Tabela 31</b> - Resultados do MIRU-15 e relação entre amplificação dos loci e ciclo médio de detecção do teste Xpert® MTB/RIF.....	105
<b>Tabela 32</b> - Diversidade alélica calculada por meio do Hunter-Gaston Discriminatory Index (HGDI – Índice Discriminatório de Hunter-Gaston).....	107
<b>Tabela 33</b> - Resultados da quantificação para caracterização da suspensão de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	119
<b>Tabela 34</b> - Características das amostras utilizadas no pool para testes de extração de DNA .....	120
<b>Tabela 35</b> - Resultados da qPCR IS6110 com extração de DNA de <i>M. tuberculosis</i> utilizando quatro protocolos diferentes (A, B, C e D).....	120
<b>Tabela 36</b> - Sequências e principais características dos oligonucleotídeos selecionados para utilização nas qPCR in house para detecção de <i>M. tuberculosis</i> .....	122
<b>Tabela 37</b> - Valores das interações com menores $\Delta G$ (hairpins ou dímeros) entre os oligonucleotídeos das qPCR IS6110 e CIA.....	122
<b>Tabela 38</b> - Valores das interações com $\Delta G$ mais negativos (hairpins ou dímeros) entre os oligonucleotídeos das qPCR <i>senX3</i> e IS081 .....	123
<b>Tabela 39</b> - Ciclos de quantificação (Cq) obtidos na otimização da concentração dos iniciadores nas reações individuais.....	124
<b>Tabela 40</b> - Ciclos de quantificação (Cq) obtidos nas qPCR IS6110-CIA e IS1081- <i>senX3</i> em reações individuais e combinadas na etapa de otimização da concentração dos iniciadores.....	126

<b>Tabela 41</b> - Ciclos de quantificação (Cq) obtidos nas qPCR IS6110-CIA e IS1081-senX3 em reações combinadas na etapa de otimização da concentração das sondas de hidrólise.....	128
<b>Tabela 42</b> - Ciclos de quantificação (Cq) obtidos nas qPCR IS6110-CIA e IS1081-senX3 em diferentes temperaturas de pareamento. ....	130
<b>Tabela 43</b> - Resumo das eficiências das reações utilizadas para detecção da TB.....	134
<b>Tabela 44</b> - Resultados obtidos na determinação do limite de detecção das qPCR utilizadas para detecção da TB.....	135

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2RHZE	Tratamento com rifampicina (R), isoniazida (H), pirazinamida(Z) e etambutol (E) por dois meses
4RH	Tratamento com rifampicina e isoniazida por 4 meses
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BBA	<i>Binding Buffer</i> (tampão de ligação)
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CLD	<i>Cell Lysis Buffer</i> (tampão de lise celular)
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Conitec	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS
CP-I	Capítulo experimental I
CP-II	Capítulo experimental II
CP-III	Capítulo experimental III
Cq	Ciclo de quantificação
CRS	<i>Composite Reference Standard</i> (Padrão de Referência Composto)
CWD	<i>Cell Wash Solution</i> (solução de lavagem de células)
DI	Drogas ilícitas
DIVE	Diretoria de Vigilância Epidemiológica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMB	Etambutol
FIND	<i>Foundation for Innovative New Diagnostics</i> (Fundação para Novos Diagnósticos Inovadores)
FN	Falso-negativo
FP	Falso-positivo
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HU/UFSC	Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina
IC95	Intervalo de confiança estabelecido em um nível de confiança de 95%
INH	Isoniazida

LACEN/SC	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina
LACL	Unidade de Laboratório de Análises Clínicas
LAMUF	Laboratório Municipal de Florianópolis
LBMMS	Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia
L-J	Löwenstein-Jensen
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i> (Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias)
MODS	<i>Microscopic Observation Drug Susceptibility</i> (Sensibilidade aos Antimicrobianos por Observação Microscópica)
MT	Meningite tuberculosa
NALC	N-acetil L-cisteína
NaOH	Hidróxido de sódio
OADC	Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase
O-K	Ogawa-Kudoh
OMS	Organização Mundial da Saúde
PANTA	Polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina
PAS	Ácido $\rho$ -aminosalicílico
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PNB	Ácido $\rho$ -nitrobenzóico
PNCT	Programa Nacional de Controle de TB
PZA	Pirazinamida
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i> (Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição)
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico

RRDR	<i>Rifampicin Resistance-Determining Region</i> (Região Determinante de Resistência à Rifampicina)
SR	<i>Sample Reagent</i> (reagente de amostra)
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TB-MDR	TB Multirresistente
TB-XDR	TB Extensivamente Resistente
TB-TDR	TB Totalmente Resistente
TDO	Tratamento Diretamente Observado
TRM-TB	Teste Rápido Molecular para tuberculose
TRS	Trato Respiratório Superior
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
UFC	Unidade Formadora de Colônias
USAID	<i>United States Agency for International Development</i> (Agência Americana para o Desenvolvimento Internacional)
UV	Ultravioleta
VN	Verdadeiro-negativo
VP	Verdadeiro-positivo
VPP	Valor preditivo positivo
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)





## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>31</b>
2.1	AGENTE ETIOLÓGICO .....	31
2.2	HISTÓRICO DA TUBERCULOSE.....	32
2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	34
2.4	TRATAMENTO E RESISTÊNCIA.....	34
2.5	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TB .....	37
<b>2.5.1</b>	<b>Baciloscopia.....</b>	<b>38</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Cultura para micobactérias.....</b>	<b>40</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Métodos moleculares.....</b>	<b>45</b>
<b>2.5.4</b>	<b>Xpert® MTB/RIF.....</b>	<b>47</b>
2.6	MÉTODOS DE GENOTIPAGEM DE <i>M. tuberculosis</i> .....	54
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO EXPERIMENTAL I – ESTUDO RETROSPECTIVO PARA AVALIAÇÃO DO TESTE COMERCIAL XPRT® MTB/RIF E DA BACILOSCOPIA EM RELAÇÃO À CULTURA PARA DIAGNÓSTICO DA TB .....</b>	<b>57</b>
3.1	OBJETIVOS .....	57
<b>3.1.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>57</b>
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
<b>3.2.1</b>	<b>Caracterização do estudo.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Processamento das amostras.....</b>	<b>58</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Critérios de exclusão da análise de dados.....</b>	<b>59</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Xpert® MTB/RIF.....</b>	<b>59</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Cultura.....</b>	<b>60</b>
3.2.5.1	Amostras pulmonares .....	60
3.2.5.2	Amostras extrapulmonares.....	61
<b>3.2.6</b>	<b>Teste de sensibilidade.....</b>	<b>61</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Baciloscopia.....</b>	<b>62</b>
<b>3.2.8</b>	<b>Coleta e análise dos dados.....</b>	<b>63</b>
<b>3.2.9</b>	<b>Aspectos éticos.....</b>	<b>63</b>
3.3	RESULTADOS .....	64
<b>3.3.1</b>	<b>Amostras pulmonares.....</b>	<b>66</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Amostras extrapulmonares.....</b>	<b>70</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Resistência à rifampicina.....</b>	<b>75</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Sumário dos resultados do CE-I.....</b>	<b>75</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO EXPERIMENTAL II – ESTUDO PROSPECTIVO PARA AVALIAÇÃO DO TESTE COMERCIAL XPRT® MTB/RIF E DA BACILOSCOPIA EM RELACÃO À</b>	

**CULTURA sólida e líquida PARA DIAGNÓSTICO DA TB E APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR A PARTIR DE RESTOS DE REAÇÃO DO TESTE XPERT® MTB/RIF ..... 77**

4.1	OBJETIVOS.....	77
4.1.1	Objetivo Geral.....	77
4.1.2	Objetivos Específicos.....	77
4.2	METODOLOGIA.....	78
4.2.1	Caracterização do estudo e recrutamento dos pacientes....	78
4.2.2	Critérios de exclusão.....	78
4.2.3	Processamento das amostras.....	79
4.2.4	Descontaminação e concentração pelo método de NALC-NaOH.....	80
4.2.5	Cultura líquida manual.....	80
4.2.6	Análise dos dados.....	81
4.2.7	Obtenção do DNA genômico a partir dos restos de reação do teste Xpert® MTB/RIF.....	82
4.2.8	Extração de DNA de isolados clínicos.....	82
4.2.9	MIRU-15 a partir dos restos do teste Xpert® MTB/RIF e dos DNAs de isolados clínicos extraídos pelo CTAB.....	83
4.2.10	Spoligotyping a partir dos restos do teste Xpert® MTB/RIF e dos DNAs de isolados clínicos extraídos pelo CTAB.....	86
4.2.11	Análise conjunta de spoligotyping e MIRU.....	88
4.2.12	Aspectos éticos.....	88
4.3	RESULTADOS.....	88
4.3.1	Padronização e avaliação preliminar da descontaminação pelo método NALC/NaOH para a cultura líquida manual.....	88
4.3.2	Comparação entre cultura líquida manual com descontaminação pelo método do NALC-NaOH e cultura sólida...	89
4.3.3	Caracterização dos participantes.....	90
4.3.4	Avaliação dos testes em amostras pulmonares.....	93
4.3.5	Avaliação dos testes em amostras extrapulmonares.....	99
4.3.6	Avaliação do teste Xpert® MTB/RIF na detecção de resistência à rifampicina.....	102
4.3.7	MIRU-15.....	103
4.3.8	Spoligotyping.....	107
4.3.9	Análise combinada de spoligotyping e MIRU-15.....	108
4.3.10	Sumário dos resultados do CE-II.....	111
5	CAPÍTULO EXPERIMENTAL III – DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE PCR	

<b>QUANTITATIVA PARA DETECÇÃO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b> .....	<b>112</b>
5.1 OBJETIVOS .....	112
5.1.1 Objetivo Geral.....	112
5.1.2 Objetivos específicos .....	112
5.2 METODOLOGIA .....	112
5.2.1 Extração do DNA .....	112
5.2.2 Desenvolvimento e validação da qPCR <i>in house</i> .....	114
5.2.2.1 Desenho dos oligonucleotídeos.....	115
5.2.2.2 Desenvolvimento e otimização da qPCR.....	116
5.2.2.3 Concentração dos iniciadores e sondas.....	117
5.2.2.4 Temperatura de pareamento dos iniciadores.....	117
5.2.2.5 Eficiência dos iniciadores .....	118
5.2.2.6 Limite de detecção .....	118
5.3 RESULTADOS .....	119
5.3.1 Extração de DNA de amostras clínicas .....	119
5.3.2 Padronização e otimização da qPCR multiplex <i>in house</i> .....	121
5.3.2.1 Oligonucleotídeos .....	121
5.3.2.2 Concentração dos iniciadores e sondas de hidrólise .....	123
5.3.2.3 Temperatura de pareamento.....	129
5.3.2.4 Eficiência dos iniciadores .....	131
5.3.2.5 Limite de detecção .....	134
5.3.3 Sumário dos resultados do CE-III.....	135
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>137</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>153</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>155</b>
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	174
APÊNDICE B – Termo Consentimento Livre e Esclarecido para dependentes e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido.....	176
ANEXO A – Artigo “Molecular profiling of drug resistant isolates of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in the state of Santa Catarina, southern Brazil”.....	178
ANEXO B – Artigo “First insight into the molecular epidemiology of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in Santa Catarina, southern Brazil”.....	179
ANEXO C – Artigo “Molecular epidemiology of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strains from prison populations in Santa Catarina, Southern Brazil”.....	180

**ANEXO D – Artigo “Performance of centralized versus decentralized tuberculosis treatment services in Southern Brazil, 2006–2015” ..... 181**

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). No ano de 2016, foram estimados 10,4 milhões de novos casos no mundo, sendo 1,03 milhão em pessoas vivendo com o HIV (*Human Immunodeficiency Virus* – Vírus da Imunodeficiência Humana), e 1,77 milhão de mortes causadas pela doença, dentre essas, 374 mil em pessoas coinfectadas por TB/HIV (WHO, 2017).

O Brasil está entre os 20 países com alta carga de TB associada ao HIV (WHO, 2016). No estado de Santa Catarina (SC) foram notificados mais de 1900 casos novos de TB em 2014 (DIVE, 2016). Em geral, 15 a 20% dos casos são causados pela forma extrapulmonar, percentual que pode atingir 50% nos casos de coinfeção TB/HIV (MEHTA et al., 2012). O estado de SC apresenta a segunda maior taxa de infecção por HIV no Brasil e as taxas de coinfeção TB/HIV (mais de 20%) estão acima da média nacional (15%) (BRASIL, 2012).

A baciloscopia e a cultura são os dois principais métodos laboratoriais utilizados para diagnóstico da TB ativa. Apesar de ser rápida e com alta especificidade, a baciloscopia tem limite de detecção em torno de 5.000-10.000 bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR)/mL, o que torna a sensibilidade diagnóstica do método moderada (60-70%), especialmente em amostras extrapulmonares. Já a cultura apresenta limite de detecção de 10-100 bacilos/mL, por isso é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da doença, porém a liberação do resultado pode levar até oito semanas em meio de cultura sólido e até seis semanas em meio de cultura líquido (NAHID et al., 2012). Dessa forma, há necessidade urgente de metodologias que aumentem a sensibilidade diagnóstica e diminuam o tempo de liberação do resultado em relação à cultura.

Os métodos moleculares constituem uma alternativa viável para o diagnóstico da TB extrapulmonar, uma vez que fornecem o resultado em poucas horas, são mais sensíveis do que a baciloscopia e mais rápidos do que a cultura, especialmente nos casos paucibacilares (LIRA et al., 2012; RICHARDSON; SAMSON; BANAEI, 2009). Vários métodos baseados na Reação em Cadeira da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) estão descritos na literatura objetivando a detecção de diversos alvos moleculares como a sequência de inserção *IS6110*, o gene 16S rRNA, o gene da proteína MPB64/MTP64, o gene *devR* e o gene *rpoB* (MEHTA et al., 2012).

Por meio de uma parceria público-privada, os esforços mundiais na busca da melhoria do diagnóstico da TB resultaram no desenvolvimento de um sistema baseado em uma PCR *semi-nested* em tempo real, o Xpert® MTB/RIF (BOHEME et al., 2010; WHO, 2013a). Além de detectar a presença do bacilo da TB, o teste Xpert® MTB/RIF detecta também a resistência à rifampicina, por meio de sondas *molecular beacon* direcionadas à região hipervariável de 81 pares de base do gene *rpoB* (códon 507-533), onde estão localizadas as principais mutações que dão origem à resistência à rifampicina (COHEN; SOMMERS; MURRAY, 2003; SENNA et al., 2006).

O método possui alta sensibilidade e especificidade para amostras pulmonares, no entanto, a sensibilidade para amostras extrapulmonares tem grandes variações, principalmente pelo baixo número de amostras utilizadas nos estudos da literatura, especialmente no Brasil (MAYNARD-SMITH et al., 2014).

Embora os métodos moleculares comerciais tenham resultados mais consistentes, os métodos desenvolvidos e padronizados no próprio laboratório (*in house*) podem reduzir os custos do desenvolvimento e aplicação no diagnóstico da TB (SANJUAN-JIMENEZ et al., 2015). A sequência de inserção IS6110 é amplamente utilizada nos testes e, apesar de ter limitada especificidade, pode estar presente em múltiplas cópias, o que aumenta o número de alvos para amplificação e, conseqüentemente, a sensibilidade dos testes que utilizam essa região do DNA para o diagnóstico da TB.

Alguns estudos demonstram que outro alvo altamente conservado, o sistema regulatório de dois componentes *senX3-regX3*, pode ser um bom alvo para o diagnóstico da TB (REED et al., 2016; SANJUAN-JIMENEZ et al., 2013, 2015). Ao contrário da IS6110, que pode não estar presente no genoma de algumas cepas de MTB, esse sistema é importante para a virulência da bactéria e precisa estar presente para sua sobrevivência e crescimento dentro do macrófago (PARISH et al., 2003).

Assim, é de extrema importância o desenvolvimento e avaliação de um teste molecular *in house*, para que se obtenha um teste de baixo custo, rápido e confiável para o diagnóstico da TB.

A tese foi dividida em três capítulos experimentais, sendo o capítulo experimental I (CE-I) um estudo descritivo retrospectivo para avaliação do teste Xpert® MTB/RIF em amostras de rotina; o capítulo experimental II (CE-II) um estudo descritivo prospectivo avaliando o teste Xpert® MTB/RIF em relação à cultura sólida e líquida e aplicação de metodologias de epidemiologia molecular diretamente de restos de

reação do teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF e o capítulo experimental III (CE-III) o desenvolvimento e a otimização de uma qPCR para diagnóstico da TB utilizando sondas de hidrólise.





## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

A TB é causada por bactérias do CMTB, formado por sete espécies (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* e *M. peniipeddi*), inclusive a cepa *M. bovis* BCG. Apesar de ser considerada uma cepa não patogênica, *M. bovis* BCG pode causar complicações raras como linfadenite supurativa em recém-nascidos vacinados com BCG, especialmente nos portadores de imunodeficiências (BUKHARI et al., 2016; GULD et al., 1955).

Há uma hipótese de que o gênero *Mycobacterium* tenha surgido há mais de 150 milhões de anos (HAYMAN, 1984). Estimativas mais rigorosas sugerem que um ancestral da espécie já infectava homínídeos do leste da África há 3 milhões de anos (GUTIERREZ et al., 2005), mas cepas modernas de *M. tuberculosis* provavelmente surgiram há cerca de 15.000 a 20.000 anos (SREEVATSAN et al., 1997).

As bactérias do CMTB pertencem ao reino Bacteria, filo Actinobacteria, classe Actinobacteria, subclasse Actinobacteridae, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacterineae, família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium* (EUZEBY, 2016). Além das bactérias do CMTB, no gênero *Mycobacterium* estão outras espécies conhecidas como micobactérias não tuberculosas (MNT), causadoras das micobacterioses.

Bactérias pertencentes ao CMTB são imóveis, não formadoras de esporos, fracamente Gram positivas e álcool-ácido resistentes (LEBOFFE; PIERCE, 2011).

A parede celular das micobactérias contém uma grande quantidade de lipídeos, especialmente ácidos micólicos, que são essenciais para a sobrevivência de membros do gênero (MARRAKCHI; LANÉELLE; DAFFÉ, 2014). Embora outros gêneros de bactérias que estão na ordem *Corynebacteriales*, como *Nocardia*, *Corynebacterium* e *Rhodococcus*, também contenham ácidos micólicos em suas paredes celulares, as micobactérias constituem um dos gêneros com cadeias mais longas de carbono (60-90 moléculas), juntamente com outro gênero descrito mais recentemente, *Segniliparus* (BARRY III et al., 1998; BUTLER et al., 2005).

A camada lipídica presente na parede celular das micobactérias corresponde a mais da metade do seu peso seco e confere algumas características ao gênero, como álcool-ácido resistência, caráter hidrofóbico extremo, resistência ao dano (inclusive aos antimicrobianos)

e importantes propriedades imunológicas. Além disso, acredita-se que ela seja fator importante para o crescimento lento de algumas espécies, pois restringe a passagem de nutrientes (BARRERA, 2007).

O genoma completo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, a primeira cepa de *M. tuberculosis* a ser completamente sequenciada, tem 4.411.529 pares de base (pb) e cerca de 4.000 genes. A estrutura do seu ácido desoxirribonucleico (DNA) é circular e contém aproximadamente de 65% de guanina e citosina (G+C), considerado um alto percentual (COLE et al., 1998).

## 2.2 HISTÓRICO DA TUBERCULOSE

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo da TB (WHO, 2012). Entre ilustres conhecidos como John Harvard, Frédéric Bastiat, Franz Kafka e Jane Austen e outros tantos desconhecidos, a TB é provavelmente o patógeno que mais mortes causou no mundo (DANIEL, 2006).

No início do século XVII houve uma grande epidemia de casos de TB. Chamada de “Peste Branca”, ela ocorreu principalmente na Europa e durou cerca de 200 anos, estimulada pela crescente industrialização e aumento da densidade demográfica dos grandes centros urbanos, característicos da Revolução Industrial no século XVIII. A morte pela doença era considerada inevitável (FRITH, 2014; LEÃO; PORTAELS, 2007).

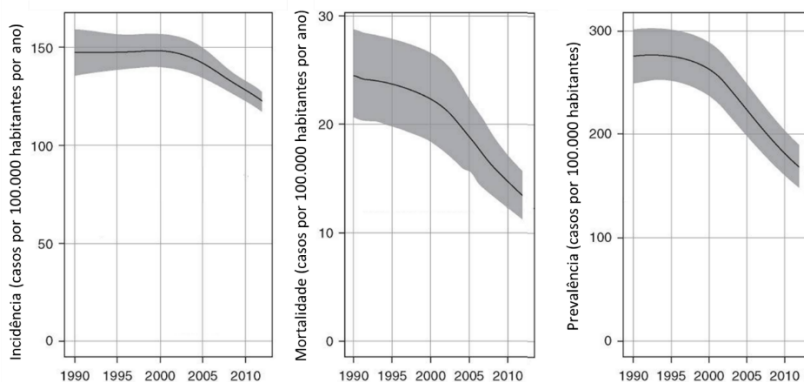
Grandes nomes da microbiologia, como Alexander Fleming e Paul Erlich, descobriram e aprimoraram diversos compostos com atividade contra microrganismos durante o século XX, época que foi denominada de Era dos Antimicrobianos (AMINOV, 2010). Após o desenvolvimento de diversos antibacterianos com atividade sobre o bacilo da TB, acreditava-se que a erradicação da doença seria alcançada até o final daquele século (SILVA; AINSA, 2007), mesmo que em algumas partes do mundo a TB tenha se mantido endêmica e negligenciada. Com o surgimento de muitos casos relacionados à coinfeção com HIV, na década de 1980, a doença e sua gravidade voltaram a ser evidenciadas mundialmente. (PALMERO, 2007). Atualmente, em pessoas que vivem com HIV, uma em cada três mortes é causada por TB (WHO, 2016).

Em 1991, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu a TB como o maior problema mundial de saúde pública, fazendo com que os esforços para a contenção da doença fossem revigorados. A resolução da Assembleia Mundial da Saúde (WHA, World Health Assembly -

órgão de decisão da OMS) propôs duas metas principais: 1) detecção de 70% dos casos novos com baciloscopia positiva e 2) cura de 85% desses casos até o ano de 2000 (WHO, 1991, 2006a). Porém, apenas uma das metas foi atingida; apesar de mais de 80% dos casos serem tratados com sucesso, apenas 45% foram detectados (WHO, 2006a)

A partir de 2000, um dos oito Objetivos de Desenvolvimento do Milênio da Organização das Nações Unidas (ONU) era parar e reverter a incidência de TB. A OMS, por meio do programa *The Stop TB Strategy* adotou essa e outras duas metas: reduzir pela metade a prevalência de TB e o número de mortes por TB até 2015 em relação a 1990. As metas foram parcialmente atingidas, especialmente a partir do ano 2000, quando os casos de TB e a mortalidade da doença tiveram uma diminuição mais acentuada em comparação aos anos anteriores, conforme pode ser observado na figura 1 (WHO, 2006b, 2016).

Figura 1 - Indicadores mundiais do número de casos e de mortes estimados de TB entre os anos de 1990 e 2012



Fonte: adaptado de GLAZIOU et al., 2015.

A ONU lançou em 2015 as Metas de Desenvolvimento Sustentável, que irão até 2030 e a OMS lançou o programa *End TB Strategy 2016-2035*. A meta para esses dois novos programas é reduzir em 90% as mortes por TB e reduzir em 80% a incidência da TB até 2030 (WHO, 2013b, 2016).

## 2.3 EPIDEMIOLOGIA

A OMS reúne dados relacionados à TB de 194 países membros e outros 22 países e territórios não membros e anualmente publica um relatório global da situação a doença (*Global Tuberculosis Report*). Em 2016, 10,4 milhões de casos novos de TB foram estimados (mas apenas 6,6 milhões foram notificados), o que resulta em uma taxa de 140 casos em 100.000 habitantes. Entre as seis regiões definidas pela OMS (Américas, Europa, África, Pacífico Ocidental, Mediterrâneo Oriental e Sudeste Asiático), a região africana (254 casos em 100.000 habitantes) e o Sudeste Asiático (240 casos em 100.000 habitantes) possuem as taxas mais altas. A coinfeção TB/HIV foi responsável por 1,03 milhão do total de casos novos. No mesmo ano, 1,4 milhão de pessoas morreram de TB e outras 374 mil pela coinfeção TB/HIV (WHO, 2017).

No Brasil, a TB está na lista de doenças ou agravos de Notificação Compulsória da Portaria 204/GM/MS, de 17/02/2016. Portanto, os casos devem ser notificados semanalmente à autoridade de saúde (BRASIL, 2016).

Entre os 30 países prioritários para o combate à TB definidos pela OMS, 20 deles contêm um alto número de casos absolutos e 10 um alto número de casos relativos (incidência per capita). O Brasil enquadra-se no segundo grupo, com uma incidência de 42 casos em 100.000 habitantes (87 mil casos novos estimados em 2016) (WHO, 2017).

Os estados do Brasil com as maiores taxas de incidência (casos notificados) são o Amazonas, com 74,1 casos em 100.000 habitantes, e o Rio de Janeiro, com 63,5 casos em 100.000 habitantes. Santa Catarina apresenta incidência de 23,7 casos notificados por 100.000 habitantes (BRASIL, 2018). Apesar da incidência em SC estar abaixo da média nacional, algumas regiões apresentam altas taxas, como a Foz do Rio Itajaí e a Grande Florianópolis com aproximadamente 60 e 45 casos novos por 100.000 habitantes, respectivamente (DIVE, 2016).

## 2.4 TRATAMENTO E RESISTÊNCIA

Considera-se que a internação em sanatórios foi o primeiro tratamento da TB. Nesses locais, geralmente regiões montanhosas de clima frio, a recuperação dos pacientes baseava-se em descanso, boa dieta e exercícios supervisionados (DANIEL, 2006). Em um estudo publicado em 1923, Cox acompanhou 4067 tuberculosos durante cinco anos e verificou que a mortalidade entre os pacientes com baciloscopia negativa na admissão foi de 14,0% para os tratados em sanatórios e

37,7% para os tratados em casa. Nos pacientes com baciloscopia positiva, a mortalidade foi de 61,0% e 81,3% para os pacientes tratados em sanatórios e em casa, respectivamente (COX, 1923).

Vários antimicrobianos foram descobertos nos anos 1940. O ácido *p*-aminosalicílico (PAS), em 1943 e as tiosemicarbazidas logo após, foram os primeiros antimicrobianos com alguma eficácia contra o bacilo da TB. Em 1944 os cientistas Albert Schatz, Elizabeth Bugle e Selman Waksman publicaram um estudo no qual demonstraram que um composto obtido a partir de culturas do fungo *Streptomyces griseus* apresentou atividade contra várias bactérias (SCHATZ; BUGIE; WAKSMAN, 1944). Esse antimicrobiano, a estreptomicina, começou a ser comercializado em 1945 pela empresa Merck Company e foi o primeiro antimicrobiano bactericida efetivo no tratamento da TB (DANIEL, 2006). O primeiro ensaio clínico randomizado demonstrou que a estreptomicina em conjunto com o repouso apresentou razoável melhora radiológica e boa melhora clínica em comparação a somente repouso, especialmente nos primeiros meses de terapia (MARSHALL et al., 1948). Porém, alguns pacientes pioravam após os três meses de início da terapia com antimicrobianos, em parte devido à resistência das bactérias à estreptomicina utilizada de forma isolada, evidenciando a necessidade de terapia combinada com outros antimicrobianos (ZUMLA; NAHID; COLE, 2013).

Após a estreptomicina começar a ser utilizada no tratamento da TB, praticamente todos os sanatórios encerraram as atividades ou foram re-enquadrados como hotéis, asilos casas de repouso ou hospitais gerais (BERTOLLI FILHO, 2001).

Embora tenha sido desenvolvida antes, a isoniazida começou a ser utilizada no tratamento da TB em 1952. Em associação com a estreptomicina e o PAS, o tratamento com os três antimicrobianos precisava ser administrado por 24 meses (MEDICAL-RESEARCH-COUNCIL, 1955). Em 1961 o etambutol substituiu o PAS, reduzindo o tratamento para 18 meses. Grandes avanços no tratamento ocorreram quando foram adicionadas a rifampicina, que reduziu o tempo de tratamento para nove meses, e a pirazinamida, com redução para seis meses (ISEMAN, 2002). No Brasil, o etambutol foi incluído no tratamento da TB apenas em 2009, quando o Ministério da Saúde emitiu uma Nota Técnica como resposta ao aumento de casos de resistência entre o Iº (1995-1997) e o IIº (2007-2008) Inquéritos Nacionais de Resistência aos Fármacos Anti-TB, que demonstraram aumento de 4,4 para 6,0% de resistência à isoniazida e de 1,1 para 1,4% de resistência à rifampicina (BRASIL, 2009).

Desta forma, desde 2009 o tratamento da TB pulmonar sem histórico de tratamento anterior consiste em duas fases. A primeira, uma fase intensiva, quando são utilizados isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida por dois meses (2RHZE) e a segunda, uma fase de manutenção, quando são utilizados somente isoniazida e rifampicina por outros quatro meses (4RH).

O regime de tratamento 2HRZE/4HR, também chamado de esquema básico, pode ser utilizado ainda nos casos de TB extrapulmonar, com exceção das infecções no sistema nervoso central, nos ossos ou nas articulações, que utilizam esquemas mais longos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Especificamente nos casos de meningite tuberculosa (MT) a segunda fase é estendida por mais três meses, totalizando sete meses nessa fase (regime de tratamento 2HRZE/7RH) (BRASIL, 2009).

A resistência aos fármacos é um grande desafio no tratamento da TB. As bactérias resistentes podem ser classificadas em monorresistentes (resistentes a apenas um fármaco de primeira linha), multirresistentes (MDR – *multidrug-resistant*; resistentes, no mínimo, à isoniazida e rifampicina), polirresistentes (resistentes a dois ou mais fármacos, exceto a associação isoniazida e rifampicina) e extensivamente resistentes (XDR – *extensively drug-resistant*; resistência à isoniazida, rifampicina, qualquer uma das fluoroquinolonas e pelo menos a um dos três aminoglicosídeos injetáveis de segunda linha, amicacina, capreomicina ou canamicina) (WHO, 2013c). Recentemente, uma nova categoria foi descrita, a totalmente resistente (TDR – *totally drug-resistant*) ou super extensivamente resistente, quando a bactéria é resistente a todos os fármacos de primeira e segunda linha (VELAYATI et al., 2009). Para o tratamento de infecções por bactérias XDR ou TDR podem ser utilizados mais de dez antimicrobianos concomitantemente (WHO, 2014a).

A resistência bacteriana é classificada em adquirida ou intrínseca. O bacilo da TB é intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos devido às características da própria bactéria, como baixa permeabilidade da parede celular ( $\beta$ -lactâmicos), alteração em alvos ribossomais (macrolídeos e lincosamidas), mimetismo do alvo (fluoroquinolonas) e alteração nos fármacos por meio de acetilação (aminoglicosídeos) (NGUYEN, 2016).

Nas bactérias em geral a resistência adquirida pode ser originada por meio de mutações ou ainda transferência horizontal de genes (mediada por plasmídeos, transposons, integrons ou fagos) (ALEKSHUN; LEVY, 2007). Em *M. tuberculosis*, ainda não foi

reportada a transferência horizontal como mecanismo e, portanto, a resistência aos fármacos é originada pela seleção de mutantes (NGUYEN, 2016). Essa seleção das bactérias resistentes é resultado quase que exclusivo das ações humanas por meio de prescrição inadequada de dosagens subterapêuticas e/ou não aderência ao tratamento. Porém, há evidências recentes de que características relacionadas à bactéria, como por exemplo, a indução de bombas de efluxo, podem facilitar o surgimento das mutações em *M. tuberculosis* (RODRIGUES et al., 2012; ZHANG; YEW, 2015).

No Brasil, os primeiros estudos epidemiológicos sobre resistência foram realizados entre 1995 e 1997, quando se verificou que a taxa de resistência primária (pacientes que nunca foram tratados com medicamentos para tuberculose) para qualquer um dos antimicrobianos foi de 8,5%, enquanto que, para a associação INH + RMP foi de 0,7%. A taxa de resistência adquirida, ou seja, em pacientes previamente tratados, foi de 21,0% para qualquer um dos antimicrobianos e para a associação INH + RMP foi de 7,9% (BRAGA; BARRETO; HIJJAR, 2003).

Em 2015 foram estimados 1900 casos de TB-MDR no Brasil, mas apenas 1197 casos foram confirmados laboratorialmente. A estimativa é de que a TB-MDR ocorra em 1,5% dos casos novos e em 8,0% dos casos previamente tratados. Além disso, o percentual de realização de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) entre casos novos é de 26% e entre casos previamente tratados, que deveria ser próximo a 100%, é de apenas 35% (WHO, 2016).

## 2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TB

Entre os métodos laboratoriais para detecção da TB, destacam-se a baciloscopia, a cultura e os testes moleculares. No Brasil, são recomendadas duas amostras para o diagnóstico da TB por meio da baciloscopia: a 1ª amostra na consulta ou visita domiciliar e a 2ª amostra na manhã do dia seguinte. Nos locais onde há disponibilidade do TRM-TB, o Ministério da Saúde indica apenas uma amostra coletada no momento da consulta ou da visita domiciliar (BRASIL, 2014).

A baciloscopia e a cultura são os dois principais métodos de diagnóstico da TB ativa (LAWN; ZUMLA, 2011). Além de serem amplamente utilizados no diagnóstico, os dois métodos também têm grande importância no acompanhamento mensal do tratamento de pacientes pois, caso a baciloscopia permaneça positiva nos pacientes em tratamento no esquema básico até o final do segundo mês, faz-se a

cultura e TSA da amostra pois há possibilidade de ser uma infecção por *M. tuberculosis* resistente ou por uma MNT (BRASIL, 2011).

Os métodos moleculares, com destaque para a PCR, revolucionaram a detecção de doenças infecciosas. Há vários estudos na literatura com metodologias padronizadas pelos pesquisadores (*in house*), mas o desenvolvimento e comercialização de kits comerciais, principalmente o teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF, foi um grande marco na detecção molecular da TB e da TB MDR já no diagnóstico.

### 2.5.1 Baciloscopia

Por ser um método simples, rápido e barato, a baciloscopia é o exame universalmente indicado para o diagnóstico da TB.

A coloração da baciloscopia baseia-se nas características da parede celular das micobactérias, que possui um grande conteúdo lipídico, especialmente ácidos micólicos. Apesar do bacilo se corar, ainda que fracamente, pelo Gram, o método não é adequado para o diagnóstico da TB.

O primeiro método utilizado para corar o bacilo da TB, apresentado por Robert Koch em 24 de março de 1882, utilizava azul de metileno em meio básico e vesuvina. Com isso, o bacilo corava-se de azul e o tecido (amostra clínica) de marrom (KAUFMANN; SCHAIBLE, 2005; KOCK, 1882). Logo após essa primeira descoberta, vários outros cientistas foram importantes no desenvolvimento da coloração álcool-ácido resistente, como Paul Ehrlich, Franz Ziehl e Friedrich Neelsen (BISHOP; NEUMANN, 1970). Atualmente, entre os métodos de coloração rotineiramente empregados nos laboratórios de análises clínicas estão o da Auramina O (com ou sem rodamina) e, mais amplamente utilizado no Brasil, o de Ziehl-Neelsen. Existem ainda as modificações desse último método, como o de Kynioun, de Gabbett e de Tan Thiam Hok (BRASIL, 2008).

No método de Ziehl-Neelsen, as micobactérias e outras estruturas são coradas pela fucsina fenicada, que penetra mais facilmente na parede celular das micobactérias quando submetida ao calor. Na descoloração, quando o material é submetido ao álcool-ácido, as micobactérias conseguem reter o corante, ao contrário das demais estruturas como células epiteliais, leucócitos e outras bactérias, de onde a fucsina fenicada se desprende. Na terceira etapa, adiciona-se o azul de metileno como corante de fundo para facilitar a visualização e gerar contraste com os BAAR, que ficam corados em vermelho (BISHOP; NEUMANN, 1970; BRASIL, 2011).



O limite de detecção da baciloscopia é em torno de 5.000-10.000 BAAR/mL (BRASIL, 2011; YEAGER et al., 1967). Com isso, a sensibilidade clínica do método varia de 50-80% para amostras pulmonares e é geralmente menor de 50% para amostras extrapulmonares (DAVIS et al., 2013; KUNKEL et al., 2016; LEE, 2015; TORTOLI et al., 2012). Sensibilidades maiores têm sido obtidas em estudos feitos com amostras de países com alta carga de TB e sensibilidades menores em países com baixa incidência. Além disso, amostras paucibacilares, como as obtidas de pacientes imunocomprometidos, crianças e idosos também são mais raramente positivas (KUNKEL et al., 2016). É importante ressaltar também que a sensibilidade pode depender do treinamento do profissional que faz a leitura das lâminas (ISLAM et al., 2013). Porém, algumas características, como a simplicidade, a velocidade de execução e de liberação do resultado, o custo baixo e exigências mínimas de equipamentos e pessoal técnico habilitado, fazem com que a baciloscopia seja o exame mais utilizado no diagnóstico da TB, especialmente em países com alta carga da doença (DAVIS et al., 2013; HALDAR et al., 2011).

O método da auramina/rodamina pode melhorar a sensibilidade clínica do método. Uma meta-análise que compilou os resultados de 45 estudos demonstrou que essa metodologia pode aumentar a detecção da TB em cerca de 10% e reduzir o tempo de leitura médio de 4 minutos para 1 minuto (STEINGART et al., 2006a). Até pouco tempo, uma grande desvantagem do método de fluorescência convencional era o custo do equipamento de fluorescência, principalmente da lâmpada de vapor de mercúrio. Entretanto, com a tecnologia de Diodo Emissor de Luz (LED – *Light Emissor Diode*), que possibilita a utilização de microscópio de campo claro, a vida útil da lâmpada aumentou e o custo de manutenção do equipamento caiu, fazendo com que o custo da análise por meio de fluorescência com LED seja próximo ao custo do método de Ziehl-Neelsen (WHITELAW et al., 2011). Em 2010 a OMS passou a recomendar a utilização de microscopia de fluorescência por LED como substituto do método de Ziehl-Neelsen, justamente por haver um incremento na sensibilidade (WHO, 2011).

Diversos estudos tentaram identificar ou desenvolver métodos para aumentar a sensibilidade clínica da baciloscopia. Um percentual expressivo de pacientes com amostras negativas na coleta de escarro espontâneo pode ser diagnosticado quando são utilizados o escarro induzido e o lavado brônquico (GOPATHI et al., 2016; KUMAR et al., 2014; RAO et al., 2016; SEONG et al., 2014). Por outro lado, um estudo

realizado por Peter e cols. (2013) demonstrou que o custo para a coleta da amostra de escarro induzido é 3,7 vezes maior que o do escarro espontâneo orientado pelo profissional de saúde e que não houve aumento na sensibilidade clínica (PETER et al., 2013).

A concentração das amostras pode aumentar consideravelmente a detecção do bacilo e os dois principais métodos são denominados Petroff e NALC-NaOH (N-acetil L-cisteína e hidróxido de sódio). Nesses métodos as amostras são liquefeitas, neutralizadas e centrifugadas para concentrar os bacilos. O esfregaço é preparado com o sedimento (KUBICA et al., 1963; PETROFF, 1915). Outros métodos de concentração menos utilizados empregam a filtração em membrana, que inclui as etapas de liquefação da amostra, filtração e transferência para uma lâmina de microscopia (FENNELLY et al., 2012; SMITHWICK; STRATIGOS, 1981) e citocentrífuga, em que o esfregaço é preparado diretamente no equipamento após liquefação da amostra (CHEN et al., 2012). Uma meta-análise com 14 artigos demonstrou que a concentração das amostras de escarro aumentou a sensibilidade em 18% (STEINGART et al., 2006b). Além disso, a concentração também pode aumentar a detecção de TB em pacientes HIV soropositivos (NWOKOYE et al., 2012; QUINCÓ et al., 2013).

Em amostras extrapulmonares, a sensibilidade do método é ainda menor devido à natureza paucibacilar da infecção. Uma vez que os mecanismos de defesa no pulmão são mais eficazes em comparação aos locais extrapulmonares, uma pequena quantidade de bactérias já é suficiente para causar a doença ativa. Além disso, outros fatores dificultam o diagnóstico em amostras extrapulmonares, como volume restrito de amostra clínica; distribuição não uniforme da bactéria na amostra e dificuldade em acessar o sítio anatômico e coletar a amostra (MEHTA et al., 2012).

### **2.5.2 Cultura para micobactérias**

A cultura é atualmente o mais sensível e específico método laboratorial para diagnóstico da TB e, por isso, é utilizada como padrão-ouro em grande parte dos estudos, especialmente para a TB pulmonar. A sensibilidade analítica é de 10-100 bacilos por mL (RIEDER et al., 2007). Porém, sua grande desvantagem é o tempo de crescimento do bacilo, que pode ser de seis a oito semanas nos meios de cultura sólidos (WHO, 2007).

De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil as principais indicações para a cultura são: 1) Sintomáticos respiratórios (SR) com

sintomas clínicos compatíveis, radiografia sugestiva e baciloscopia repetidamente negativa (três amostras); 2) Casos suspeitos de TB com amostras paucibacilares (ex.: amostras extrapulmonares) e/ou pacientes com dificuldade de coleta (ex.: crianças e indígenas); 3) contatos de casos com TB resistente; 4) pacientes com histórico de TB prévia; 5) Pacientes imunossuprimidos, principalmente as pessoas vivendo com HIV; 6) casos suspeitos de infecção por MNT; 7) pacientes com baciloscopia positiva após o 2º mês de tratamento; 8) pacientes com indicação de retratamento (como falência terapêutica, recidiva ou reinício após abandono) e; 9) em estudos epidemiológicos, por exemplo na vigilância de resistência (BRASIL, 2008).

Outra grande vantagem da cultura é que, com o crescimento da bactéria, é possível fazer o TSA, que determina se a bactéria é sensível aos antimicrobianos utilizados no tratamento da TB.

Os meios de cultura sólidos disponíveis atualmente para crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* dividem-se em dois tipos: baseados em ovo e baseados em ágar.

Os meios a base de ovo foram os primeiros a serem desenvolvidos e são a primeira escolha para amostras pulmonares (DORSET, 1902; WHO, 1998). Esses meios contêm, basicamente, ovos inteiros homogeneizados, sais orgânicos e inorgânicos e glicerol. Além disso, geralmente é adicionado o corante verde de malaquita, que inibe a biota bacteriana do trato respiratório superior e torna o meio levemente esverdeado, o que facilita a visualização das colônias (JOLOBA et al., 2014). A solidificação dos meios de cultura a base de ovos ocorre por coagulação dos ovos durante 50 minutos a 85°C (BRASIL, 2004).

Entre as principais diferenças dos meios L-J e O-K, destacam-se a maior capacidade de tamponamento e menor pH no O-K, isso porque, ao contrário do que ocorre no meio L-J, a amostra não é neutralizada e centrifugada antes de ser semeada (KUDOH; KUDOH, 1974). Outra característica do O-K é que não possui asparagina, o que o torna mais barato.

Como as amostras pulmonares vêm acompanhadas da microbiota bacteriana do trato respiratório superior, que cresce mais rápido do que as micobactérias, é necessário que essas amostras sejam descontaminadas antes da semeadura. Amostras extrapulmonares não estéreis (como tecido cutâneo, urina e fezes) também precisam ser descontaminadas. A descontaminação da amostra clínica para a semeadura também é diferente entre os dois meios. O L-J requer descontaminação, neutralização e centrifugação da amostra com o método de Petroff, NALC-NaOH ou algum outro equivalente. Já a

descontaminação para semeadura no O-K é realizada por meio da inserção de um *swab* na amostra clínica, com movimentos de giro para melhor absorção, inserção subsequente do *swab* com a amostra em uma solução de NaOH 4% por um tempo controlado e semeadura no meio de cultura (método de Kudoh). Com isso, esse método mostra-se simples de ser executado e é recomendado principalmente para laboratórios de pequeno porte ou que não possuam toda a estrutura requerida para o L-J, como cabine de segurança biológica e centrífuga. Porém, o método de O-K é utilizado somente para amostras de escarro espontâneo, enquanto o L-J é utilizado para todas as amostras clínicas (BRASIL, 2008).

De forma geral, os estudos realizados com escarro demonstram que os meios de L-J e O-K apresentam resultados semelhantes no crescimento das micobactérias, com uma ligeira vantagem não significativa para L-J (CEYHAN; SIMŞEK; TARHAN, 2012; PALACI et al., 2013; RIVAS et al., 2010; TAKAO et al., 2005).

Os meios a base de ágar foram desenvolvidos por Middlebrook e coautores na metade do século XX e utilizam ágar ao invés de ovos para sua solidificação. Em uma série de testes, observou-se que o bacilo tinha crescimento satisfatório em um meio chamado de ácido oleico/albumina (DUBOS; MIDDLEBROOK, 1947). Middlebrook e Cohn modificaram o meio para melhorar o crescimento de micobactérias e passaram a chamar de ágar 7H10 (MIDDLEBROOK; COHN, 1958). Em 1968, Cohn, Waggoner e McClatchy observaram que alguns isolados de *M. tuberculosis* cresciam pobremente no meio Middlebrook 7H10, mas com a adição de 1,0 g/L de digestão pancreática de caseína apresentavam crescimento satisfatório (COHN; WAGGONER; MCCLATCHY, 1968). Com isso, a esse meio foi dado o nome de ágar 7H11.

Entre as vantagens dos meios a base de ágar estão a ausência da necessidade de ovos livres de antimicrobianos entre os ingredientes e do equipamento coagulador, crescimento bacteriano mais rápido, área de semeadura maior, o que facilita a seleção de colônias de interesse frente às possíveis colônias contaminantes e possibilidade de adição de antimicrobianos ao meio de cultura, tornando-o mais seletivo de acordo com a necessidade (JOLOBA et al., 2014; MITCHISON et al., 1972). Porém, há necessidade de manter uma estufa com CO<sub>2</sub> para melhor recuperação do bacilo e adicionar um suplemento composto por ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (OADC), que adicionam um custo razoável ao método.

Além dos meios clássicos, há também alguns relatos na literatura da utilização de um meio de cultura que é tradicionalmente utilizado em

bacteriologia geral, o ágar sangue (AS) (ARVAND et al., 1998; MAZÓN et al., 2000). Esse meio foi utilizado pela primeira vez por Bezançon e Griffon (1903) mas logo foi deixado de lado, quando os meios a base de ovo se popularizaram (DRANCOURT et al., 2003). Mathur e cols. (MATHUR et al., 2009) demonstraram que o AS reduziu o tempo médio para visualização macroscópica de colônias de  $20,4 \pm 5,1$  para  $13,6 \pm 5,2$  dias em comparação ao meio de L-J. Ainda assim, o AS foi pouco explorado como um meio de cultivo para micobactérias.

Não há consenso sobre qual tipo de meio de cultura sólido é o melhor para ser utilizado no laboratório clínico e a escolha depende de fatores como experiência do técnico e tradição do laboratório (JOLOBA et al., 2014).

Uma vez que as culturas em meios a base de ovo e a base de ágar apresentam um tempo de crescimento elevado, foram desenvolvidas metodologias de cultura em meio líquido, que é mais rápida e mais sensível do que as técnicas tradicionais em meios sólidos (CHIEN et al., 2000). Esses métodos geralmente empregam o Middlebrook 7H9 (que contém os mesmos componentes do 7H10, com exceção de ágar e verde malaquita), com algumas modificações, especialmente adição de antimicrobianos. Além disso, a detecção pode ser manual ou automatizada, sendo que a última necessita de agentes que possibilitam a detecção do crescimento bacteriano.

Para a detecção manual, utiliza-se principalmente o meio 7H9 com detecção por meio da visualização macroscópica ou com detecção microscópica ou ainda por meio de uma lâmpada ultravioleta (UV), como no caso do *Mycobacterial Growth Indicator Tube* (MGIT – tubo indicador de crescimento micobacteriano). A detecção macroscópica torna o método mais simples, barato e factível para utilização em locais com poucos recursos. Além disso, o tempo para detecção do crescimento é próximo ao de métodos automatizados (BATTAGLIOLI et al., 2014).

O método de observação microscópica (MODS – *Microscopic-Observation Drug-Susceptibility*) foi publicado pela primeira vez em 2000 e pode ser utilizado tanto para o diagnóstico da TB como para o teste de sensibilidade (CAVIEDES et al., 2000). A cultura é feita em placas de 24 poços, mantidas hermeticamente fechadas e visualizadas periodicamente em microscópio invertido nos aumentos de 100x e 40x (MOORE et al., 2006).

Outro método que pode ser utilizado com detecção manual é o MGIT. Além de Middlebrook 7H9 modificado, o meio contém sais de rutênio marcados com fluorocromo (PFYFFER et al., 1997). A

fluorescência da molécula é inibida pela alta concentração de oxigênio presente no meio estéril e, com o crescimento do bacilo e consumo do oxigênio, a fluorescência do tubo aumenta. A detecção manual pode ser feita por meio de uma lâmpada UV em 365 nm (PALACI et al., 1996).

O primeiro sistema semiautomatizado de cultura líquida, o Bactec System, foi disponibilizado em 1977. O sistema utilizava o meio Bactec 12B, também chamado de Middlebrook 7H12, que continha os componentes básicos dos meios Middlebrook com adição de ácido palmítico marcado com carbono radioativo ( $^{14}\text{C}$ ) e de uma mistura de antimicrobianos composta por polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina (PANTA) (MIDDLEBROOK; REGGIARDO; TIGERTT, 1977). Nesse teste, após utilização do ácido palmítico pelas micobactérias é liberado dióxido de carbono radioativo ( $^{14}\text{CO}_2$ ), que é detectado pelo equipamento Bactec System (DAMATO et al., 1983). O método apresentou bom desempenho e representou um grande avanço na cultura de micobactérias, porém sua grande desvantagem era o resíduo radioativo gerado (BRUNELLO; FAVARI; FONTANA, 1999).

A partir dos anos 90 surgiram vários métodos alternativos não radiométricos, como o BACTEC MGIT960, o MB/BacT ALERT 3D e o VersaTREK/ESP II culture system. A detecção do BACTEC MGIT960 é, assim como no método MGIT manual, por meio de fluorescência produzida pelo consumo do oxigênio, conforme explicado anteriormente, porém a leitura periódica é realizada automaticamente pelo equipamento.

O MB/BacT ALERT 3D detecta o crescimento das bactérias por meio da produção de  $\text{CO}_2$ . O meio de cultura, em forma de garrafa, apresenta na sua base um sensor colorimétrico permeável a gases que, com a presença de  $\text{CO}_2$ , muda de verde para amarelo (PALACIOS et al., 1999). Após inoculação das amostras, as garrafas são incubadas no equipamento a  $37^\circ\text{C}$  e lidas a cada 10 minutos por até seis semanas e os valores obtidos são interpretados por um software (PIERSIMONI et al., 2001).

Em 1994 já estava disponível no mercado o ESP *blood culture system*, destinado à hemocultura. Alguns anos depois o equipamento e os meios foram adaptados para a cultura líquida de micobactérias. O sistema tem como fundamento a variação da pressão do meio de cultura (hermeticamente fechado) por meio do consumo ou geração de gases, indicando o crescimento de bactérias (WOODS et al., 1997). A incubação é realizada a  $35^\circ\text{C}$  por até seis semanas, com monitoramento

contínuo da pressão dentro da garrafa (THOLCKEN; HUANG; WOODS, 1997).

Em uma meta-análise publicada por Dinnes e cols. (2007), o tempo para detecção do crescimento bacteriano nesses três sistemas automatizados variou de 10 a 20 dias, com médias de 13,1 dias para o BACTEC MGIT 960, 16,2 dias para o MB/BacT ALERT 3D e 17,9 dias para o ESP *culture system II*. Em relação à sensibilidade clínica, observada na mesma meta-análise, tanto o BACTEC MGIT 960 quanto o MB/BacT ALER 3D apresentaram vantagens significativas em relação à cultura sólida. O ESP II *system*, porém, não foi significativamente melhor do que a cultura sólida (DINNES et al., 2007).

Ainda que a cultura tenha um bom limite de detecção analítico, em alguns casos, como no diagnóstico da TB pulmonar em crianças, seu valor preditivo negativo não é tão alto quanto desejável e, em alguns casos, as metodologias moleculares têm desempenho superior pois a sensibilidade é maior do que a da cultura (DINARDO et al., 2016).

### 2.5.3 Métodos moleculares

Os métodos moleculares apresentam uma ótima perspectiva para contornar os problemas encontrados nos métodos clássicos (cultura e baciloscopia) pois têm sensibilidade melhor do que a baciloscopia e fornecem um resultado mais rápido do que a cultura, especialmente nos casos paucibacilares (LIRA et al., 2012; RICHARDSON; SAMSON; BANAEI, 2009).

Entre os métodos moleculares mais utilizados, está a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações (ponto final, qPCR, *nested-PCR*, entre outros). Há ainda vários testes que fazem a revelação por meio de ensaios com sondas de DNA (*Line Probe Assays - LPA*). Mais recentemente, métodos de amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP – *Loop-mediated isothermal Amplification*) também foram descritos e vêm sendo utilizados, inclusive por kits comerciais.

Entre os principais alvos para aplicação dos métodos moleculares *in house* estão as sequências de inserção (como a IS6110 e a IS1081), o componente 16S-rRNA, o gene da proteína MPB64/MTP64 e o gene *devR* (MEHTA et al., 2012).

A IS6110 é uma sequência de inserção específica de bactérias do CMTB, que podem apresentar até 25 cópias no genoma (MCEVOY et al., 2007). Embora alguns estudos descrevam cepas com ausência da IS6110 (LOK et al., 2002), esse é um dos principais alvos de metodologias moleculares tanto para diagnóstico da TB quanto para

estudos epidemiológicos (ROYCHOWDHURY; MANDAL; BHATTACHARYA, 2015). Porém, há muitas variações genômicas entre cepas e até entre as cópias da mesma cepa (SANKAR et al., 2011). Além disso, pode ocorrer falso positivo devido à homologia com outras espécies de micobactérias e outras bactérias, especialmente em amostras pulmonares, onde pode haver MNT que colonizam o trato respiratório superior (TRS) (SANJUAN-JIMENEZ et al., 2015). Especialmente em isolados com baixo número de cópias de IS6110, outra sequência de inserção pode ser utilizada como alvo complementar, a IS1081. A IS1081 é mais estável do que a IS6110 e está presente em número de 5 a 7 cópias por genoma (COLLINS; STEPHENS, 1991).

O componente 16S do RNA ribossomal (16S-rRNA) está presente nos ribossomos dos procariotos, mas possui regiões hipervariáveis que são espécie-específicas (CHAKRAVORTY et al., 2007). O rRNA constitui aproximadamente 80% do RNA total e o número de cópias presente em uma bactéria é de 1.000 a 10.000 vezes maior do que o número de cópias do DNA genômico (WOESE, 1987). A região do 16S-rRNA é bem conservada entre as espécies CMTB. Apesar de ser amplamente utilizada, é necessário cuidado adicional na extração, devido à instabilidade maior do RNA em relação ao DNA, e de uma etapa a mais na preparação da amostra, a transcrição reversa, para que o DNA complementar possa ser utilizado como molde para a PCR (CHOI et al., 2015).

Outro alvo altamente conservado, o sistema regulatório de dois componentes *senX3-regX3*, pode ser um bom alvo para o diagnóstico da TB. A primeira descrição desse sistema para o diagnóstico da TB foi feita em 1998 e mais recentemente outros estudos demonstraram que esse alvo possui uma boa acurácia para o diagnóstico da TB (MAGDALENA et al., 1998; REED et al., 2016; SANJUAN-JIMENEZ et al., 2013, 2015). Ao contrário da IS6110, que pode não estar presente no genoma de algumas cepas de MTB, esse sistema é importante para a virulência da bactéria e precisa estar presente para a sobrevivência e crescimento da bactéria dentro do macrófago (PARISH et al., 2003).

Os métodos moleculares podem ser desenvolvidos no próprio laboratório (*in house*) ou comerciais, como por exemplo Xpert® MTB/RIF (Cepheid, EUA), TB-LAMP (Eiken, Japão) e COBAS TaqMan MTB (Roche, EUA). Embora os testes comerciais tenham resultados mais consistentes, os métodos *in house* podem baratear o desenvolvimento e aplicação do diagnóstico da TB (SANJUAN-JIMENEZ et al., 2015).



### 2.5.4 Xpert® MTB/RIF

Entre as metodologias moleculares automatizadas, o Xpert® MTB/RIF foi uma grande revolução para o diagnóstico da TB. Em um estudo publicado em 2001 pelo grupo do Dr. David Alland, foram testadas cinco sondas (*molecular beacons*) para detecção de resistência à rifampicina em um tubo único. O estudo encontrou uma alta sensibilidade analítica para detecção de mutações presentes no gene *rpoB* de isolados clínicos resistentes à rifampicina (EL-HAJJ et al., 2001). Em 2006, a empresa Cepheid, a instituição FIND (*Foundation for Innovative Diagnostics*) e o laboratório do Dr. David Alland (*Rutgers New Jersey Medical School*) se uniram para desenvolver um teste molecular para a detecção de TB e da multirresistência aos antimicrobianos (WHO, 2013a). A iniciativa ainda contou com o financiamento da Fundação Bill e Melinda Gates e do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos EUA (NIAID – *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*) (ALBERT et al., 2016).

A empresa Cepheid (EUA) já havia desenvolvido em 2001 um teste para rastreamento de *Bacillus anthracis* nas cartas suspeitas de conterem esporos do bacilo enviadas à imprensa e aos senadores Tom Daschle e Patrick Leahy (ULRICH et al., 2006). Naquele ano, foram registradas cinco mortes causadas pela bactéria e 17 pessoas sobreviveram à infecção (MAYER et al., 2003).

A partir de julho de 2008, o teste para detecção da TB e da resistência à rifampicina (marcador de MDR) começou a ser aplicado em cinco cidades com alta prevalência de TB e os dois primeiros estudos clínicos foram publicados em 2009 e 2010, demonstrando ótimas sensibilidade e especificidade clínicas, inclusive para casos com baciloscopia negativa (BOHEME et al., 2010; HELB et al., 2010). No final de 2010, a OMS endossou o kit Xpert® MTB/RIF. Assim, o Xpert® MTB/RIF obteve recomendação forte para ser utilizado no diagnóstico de pacientes com suspeita de MDR e nas pessoas que vivem com o HIV (WHO, 2016).

Ainda que a tecnologia estivesse validada, era necessário disponibilizar os kits a um preço acessível para países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (LAWN; ZUMLA, 2011). Por esse motivo, houve subsídio para os países prioritários e a redução estimada dos custos foi de 75% para os reagentes e 50% para os equipamentos (WHO, 2014b)

A lista dos países prioritários, que inclui o Brasil, foi definida pela instituição FIND baseando-se em indicadores como número

absoluto de casos, número relativo de casos, número de pessoas vivendo com o HIV e percentual de TB-MDR. Essa lista encontra-se disponível na página <http://www.who.int/tb/laboratory/xpertmap>.

Em agosto de 2012, outro grande passo para reduzir o custo do teste foi tomado. O PEPFAR (*President's Emergency Plan for AIDS Relief*), a USAID (*United States for International Development*), a Unitaid e a Fundação Bill e Melinda Gates negociaram um acordo com a Cepheid, para que o custo subsidiado do teste para países elegíveis fosse reduzido de US\$ 16,68 para US\$ 9,98 (ALBERT et al., 2016). Além disso, o custo do equipamento GeneXpert anunciado era de US\$ 17.000, não incluídos os custos de frete (WHO, 2014c). Desta forma, desde 2010 o número de equipamentos fornecidos e testes realizados com custos subsidiados aumentam gradativamente (ALBERT et al., 2016).

O Brasil, sendo um dos países detentores da alta carga de TB, iniciou os testes com essa nova tecnologia com um estudo piloto de implementação em duas cidades prioritárias: Manaus e Rio de Janeiro (DE CAMARGO et al., 2015). Entre os resultados obtidos, houve um incremento no diagnóstico laboratorial de 34% (BRASIL, 2013a) e um aumento de apenas 1,7% dos custos com a substituição da baciloscopia pelo Xpert® MTB/RIF, custos estes que poderiam ser reduzidos em outros serviços para que torne-se custo-efetivo (PINTO et al., 2016). Um outro resultado interessante é que a utilização do Xpert® MTB/RIF levou a uma redução de custos para o paciente de R\$ 60,58 (US\$ 25,24; cotação de 2014) para R\$ 39,46 (US\$ 16,44) por diagnóstico. Esses custos são explicados, por exemplo, pelos gastos com alimentação, transporte e perda de tempo para o deslocamento até o local de coleta de amostras, uma vez que para o teste Xpert® MTB/RIF é necessária apenas uma amostra, enquanto que para a baciloscopia o PNCT recomenda a coleta de duas amostras (DA SILVA ANTUNES; PINTO; TRAJMAN, 2014)

Em 2013, com a publicação da Portaria nº 48, de 10 de setembro de 2013, o Ministério da Saúde, por meio da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos e com embasamento no Relatório nº 49 (Proposta de Incorporação do Xpert® MTB/RIF Como Teste para Diagnóstico de TB e para Indicação de Resistência à Rifampicina) da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC), “torna pública a decisão de incorporar o teste Xpert® MTB/RIF para diagnóstico de casos novos de TB e detecção de resistência à rifampicina no Sistema Único de Saúde – SUS” (BRASIL, 2013a, 2013b)

Após o estudo piloto, o Programa Nacional de Controle da TB

(PNCT) adquiriu 160 equipamentos e cartuchos e distribuiu para os laboratórios para substituição da baciloscopia pelo denominado Teste Rápido Molecular para TB (TRM-TB), o Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF. A Rede de TRM-TB no Brasil começou a entrar em atividade em maio de 2014, quando foram distribuídos 148 aparelhos em 125 laboratórios de 92 municípios. Além disso, juntaram-se à rede outros laboratórios que já possuíam o GeneXpert (15 equipamentos) e instituições públicas que adquiriram o equipamento (quatro equipamentos). No primeiro ano de operação da rede foram realizados 146.939 testes (BRASIL, 2015).

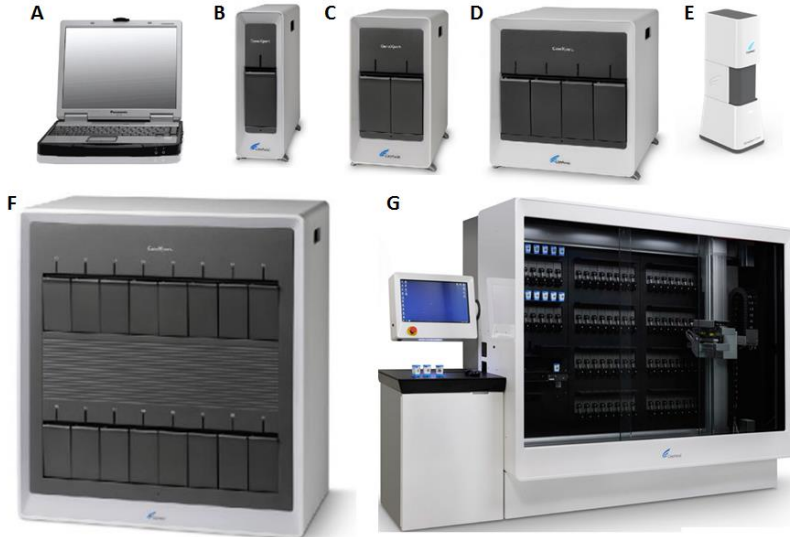
Em agosto de 2014, o PNCT divulgou uma “Seleção de Propostas de Pesquisa Envolvendo o Teste Rápido Molecular para a TB (TRM-TB) no SUS”, para empréstimo dos 12 equipamentos restantes e fornecimento de cartuchos Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF para projetos de pesquisa, na qual um projeto de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) foi contemplado.

Assim, SC conta com seis equipamentos em cinco laboratórios de três municípios. Em Florianópolis, dois equipamentos estão no Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN-SC), um está no Laboratório Municipal de Florianópolis (LAMUF) e outro está no LBMMS-HU/UFSC (Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina). O Laboratório Municipal de Itajaí conta com um equipamento e o Laboratório Municipal de Joinville também recebeu um equipamento (BRASIL, 2015).

O teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF é dividido em dois componentes principais: o equipamento GeneXpert e o cartucho plástico descartável Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF. O equipamento GeneXpert conta com: 1) sistema de processamento da amostra, onde é feita a extração do DNA potencialmente presente na amostra clínica, a hidratação dos reagentes liofilizados e a mistura dos componentes e; 2) termociclador com detector de fluorescência.

Existem diversos modelos do equipamento, que pode variar de um (GeneXpert I) a 80 módulos (GeneXpert Infinity) (Figura 2). Os módulos são independentes, ou seja, cada módulo contém seus componentes próprios para processamento da amostra e detecção da amplificação.

Figura 2 - Equipamentos GeneXpert (Cepheid). A: Computador Notebook (pode ser adquirido com desktop também). B: GeneXpert I; C: GeneXpert II; D: GeneXpert IV; E: GeneXpert Omni (point-of-care); F: GeneXpert XVI and G: GeneXpert Infinity.



Fonte: Adaptado de CEPHEID, 2012.

No preparo para o teste, o reagente de amostra (*sample reagent – SR*), que contém NaOH e isopropanol, é adicionado à amostra em uma proporção 2:1 (amostras sem nenhum tipo de tratamento) ou 3:1 (amostras concentradas ou sedimentos após centrifugação) (BLAKEMORE et al., 2010). A mistura é homogeneizada em um misturador do tipo vórtex e aguarda-se 15 minutos para liquefazer a amostra e inativar o bacilo, minimizando o risco ocupacional (BANADA et al., 2010). Após esse tempo, transfere-se 2 mL da mistura amostra-SR para o cartucho, que pode ser colocado em um dos módulos independentes do equipamento GeneXpert, e inicia-se o teste com o software próprio do equipamento.

Todos os procedimentos seguintes são realizados pelo próprio equipamento. Após iniciar o teste, 200  $\mu$ L da amostra são utilizados para suspender os esporos de *Bacillus globigii* (controle interno de amplificação para detectar inibidores de PCR) e passados por um filtro submicrônico. Outros 1.200  $\mu$ L são passados diretamente pelo mesmo filtro. Assim, os esporos do controle interno e de qualquer bacilo

potencialmente presente na mistura ficam retidos no filtro. O filtro é lavado com um tampão para remoção dos inibidores de PCR e neutralização do reagente SR e submetido ao processo de sonicação para lise das bactérias e liberação do material genético. Na etapa final da extração, o DNA é eluído em 90 µL de tampão (HELB et al., 2010).

Dentro do cartucho há também os reagentes liofilizados para a PCR, incluindo os *primers* e as sondas específicas para a região Região Determinante de Resistência à Rifampicina (RRDR – *Rifampicin Resistance Determining Region*) do gene *rpoB* de *M. tuberculosis*. Assim, a mistura contendo os reagentes liofilizados para a primeira das duas reações da PCR *semi-nested* é movida para a câmara de leitura do equipamento GeneXpert e submetida à seguinte programação: um ciclo de ativação a 95°C por 120 segundos, seguido por 16 ciclos de 95°C por 5 segundos e 72°C por 40 segundos. O resultado da primeira PCR é movido até uma outra câmara do cartucho, onde os reagentes da segunda PCR são hidratados, e retornados à câmara de leitura, onde é feito o controle de inspeção das sondas para verificar se foram hidratadas adequadamente. Após as sondas apresentarem resultados satisfatórios, a segunda PCR segue com seguintes passos: 95°C por 120 segundos, seguido por 45 ciclos de 95° por 5 segundos, 64°C por 20 segundos e 72° por 30 segundos. A detecção é feita por meio de detectores de fluorescência para fluoresceína (sonda E) e outros cinco fluoróforos (sondas A, B, C, E e sonda para *B. globigii*) não revelados pela empresa (HELB et al., 2010).

As cinco sondas utilizadas para detectar o DNA de *M. tuberculosis* no teste são do tipo *molecular beacon* e contêm também inibidores de fluorescência (*quencher*s). Elas cobrem todos os 81 pares de base da RRDR. Os iniciadores e as sondas estão na Tabela 1.

Tabela 1 - Iniciadores e sondas utilizados no teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF. Na coluna das seqüências, as letras em minúsculo indicam homologia com o DNA de *M. tuberculosis*, enquanto as letras em maiúsculo indicam a complementariedade para formação da haste da sonda do tipo *molecular beacon*

Iniciador/Sonda	Seqüência
Iniciador <i>rpoB</i> F1	5'- cgtggaggcgatcacaccgcagac -3'
Iniciador <i>rpoB</i> F2	5'- atcaacatccggccggtggtcgcc -3'
Iniciador <i>rpoB</i> R	5'- agCtccagcccggcagctcactg -3'
Sonda A ( <i>rpoB</i> )	5'-CF <sup>3</sup> 6-CGAGCtcaagctggctggtgcGCTCG- Q <sup>4</sup> 8-3'
Sonda B ( <i>rpoB</i> )	5'-CF4- TGTGgagccaattcatggaccagaGCACA-Q13-3'
Sonda C ( <i>rpoB</i> )	5'-CF5- CCGACGccgacagcgggtgttCGTCCG-Q8-3'
Sonda D ( <i>rpoB</i> )	5'-CF3-CCACGcttgggtcaaccccCGTGG- Q13-3'
Sonda E ( <i>rpoB</i> )	5'-Fluoresceine- ACGAGccgactgtcggcgcuggCTCGT-Q13-3'
Iniciador <i>B. globigii</i> F	5'- agcgcttgcggcaaacacggagaaa -3'
Iniciador <i>B. globigii</i> R1	5'- gcgacaccggcgaatacacagatacc -3'
Iniciador <i>B. globigii</i> R2	5'- gctccaccgaacaatccgatcttaccgccc -3'
Sonda <i>B. globigii</i>	5'-CF1- GGCCGacagacaaggctccttattgatCGGCC-Q8-3'

Legenda: CF: fluoróforos de propriedade da empresa Cepheid. Q: *quencher*s de propriedade da empresa Cepheid.

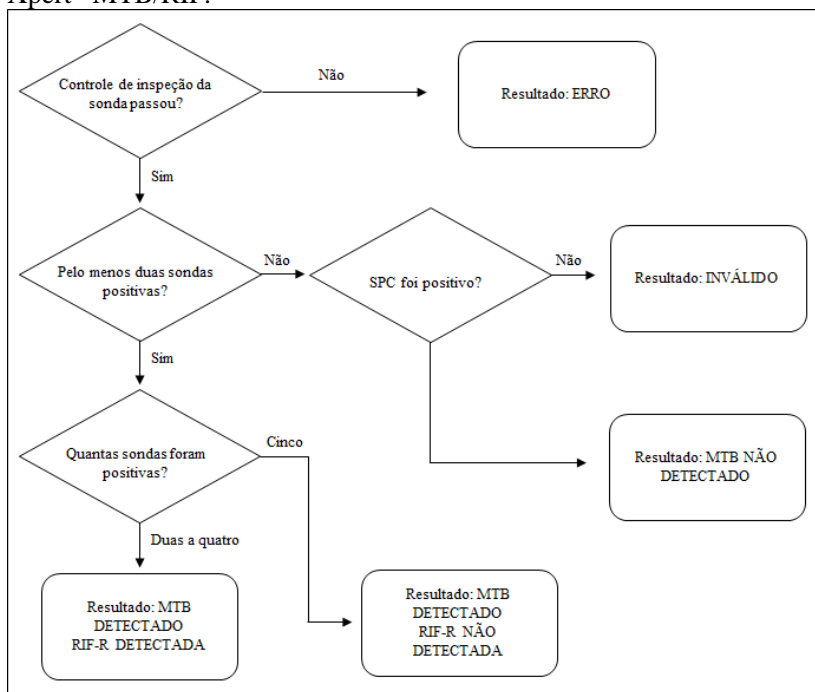
Fonte: HELB et al., 2010

Na interpretação do teste, o resultado é positivo se pelo menos duas das cinco sondas forem positivas, a média dos ciclos de quantificação (Cq) for menor ou igual a 38 e a diferença entre os Cq de pelo menos duas sondas for menor ou igual a 2. O teste é negativo se as sondas direcionadas contra o *M. tuberculosis* não forem detectadas, mas as sondas do controle interno (esporos de *Bacillus globigii*) forem detectadas. Se a sonda do controle interno de amplificação não for detectada, o resultado é inválido. Em relação à resistência à rifampicina, o teste é positivo se a diferença entre o maior e o menor Cq das sondas para *M. tuberculosis* for maior do que 3,5. Além disso, se a primeira

sonda a ser detectada tiver um Cq maior do que 34,5 ciclos e a última sonda um Cq maior do que 38 ciclos, o resultado da resistência à rifampicina é indeterminado pois não é possível estabelecer se houve uma diferença maior do que 3,5 ciclos (BLAKEMORE et al., 2010).

A Figura 3 mostra o fluxograma interno de interpretação do teste Xpert® MTB/RIF.

Figura 3 - Fluxograma interno do software para avaliar os resultados do Xpert® MTB/RIF.



Legenda: MTB: *Mycobacterium tuberculosis*; RIF-F: resistência à rifampicina; SPC: controle de processamento da amostra (*Sample Processing Control*).

Fonte: Adaptado de CEPHEID, 2012.

Recentemente, o Xpert® MTB/RIF sofreu modificações e os testes de validação do Xpert® MTB/RIF Ultra estão em andamento. As cinco sondas utilizadas para detectar o gene *rpoB* no teste Xpert® MTB/RIF foram substituídas por quatro sondas no gene *rpoB* e outras

duas sondas foram adicionadas: uma para detectar a região IS6110 e outra para a IS1081, ambas presentes no DNA de bactérias do CMTB. Além disso, o tubo de reação passou de 25 µL para 50 µL e o tempo total médio de reação diminuiu de 114 minutos para 57 minutos nas amostras negativas e 71 minutos para amostras positivas (CHAKRAVORTY et al., 2017; JONES et al., 2016).

Outra importante modificação foi a detecção de mutações relacionadas à resistência à rifampicina. O novo teste utiliza a metodologia *High Resolution Melting* (temperatura de pareamento dos iniciadores de alta resolução), que detecta as mutações por meio da mudança da temperatura de pareamento em relação à sequência sem mutações.

As modificações fizeram com que o limite de detecção diminuísse de 50 para 5 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL de *M. tuberculosis* e 165 para 25 UFC/mL de *M. bovis* BCG (ALLAND et al., 2015).

Com isso, espera-se aumentar a sensibilidade clínica da metodologia, uma vez que os elementos de inserção IS6110 e IS1081 estão presentes em número variado no genoma de bactérias do CMTB, aumentando assim o número de alvos para amplificação. Os fabricantes esperam também aumentar o valor preditivo negativo para reduzir o número pacientes com tratamento empírico (AEL, 2016).

Além disso, será lançado um novo teste, especificamente para detecção de TB XDR e que consegue detectar as mutações que dão origem à resistência à isoniazida, rifampicina, fluoroquinolona e aminoglicosídeos injetáveis de segunda linha (XIE et al., 2017).

## 2.6 MÉTODOS DE GENOTIPAGEM DE *M. tuberculosis*

A genotipagem de bactérias do complexo *M. tuberculosis* pode auxiliar na compreensão da dinâmica de transmissão, na diferenciação entre recidiva ou reinfecção em um segundo episódio da doença, na investigação e confirmação de surtos (ou ainda na confirmação de contaminação laboratorial) e na identificação dos clones de maior ocorrência, inclusive os clones de bactérias multirresistentes (BARNES; CAVE, 2003; TESSEMA et al., 2013).

Apesar de vários outros métodos estarem disponíveis para genotipagem de *M. tuberculosis* (como RAPD-PCR, AFLP, MLST, PFGE, Rep-PCR, PGRS-RFLP) os mais utilizados são o *spoligotyping* (*spacer oligonucleotide typing*), o MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repeat Units - Variable-Number Tandem-Repeat*) e RFLP-



IS6110 (*Restriction Fragment Length Polymorphism* do gene IS6110) (EI et al., 2016; ROZO-ANAYA; RIBÓN, 2010; VIEDMA; MOKROUSOV; RASTOGI, 2011).

O polimorfismo dos fragmentos de restrição da sequência de inserção IS6110 (RFLP-IS6110) tem como fundamento o número e a distribuição no genoma da sequência de inserção IS6110, que possui 1361 pb. Embora esse elemento possa estar presente de zero a 25 cópias, a maioria das cepas contém de oito a quinze (AMLEROVA; BITAR; HRABAK, 2018). Os fragmentos são gerados com a utilização da enzima de restrição *PvuII* e analisados por meio de sondas que hibridizam na IS6110. Assim, as cepas que pertencem a um mesmo *cluster* (epidemiologicamente relacionadas) possuem o mesmo número e tamanho de fragmentos (VAN SOOLINGEN et al., 1994). Apesar de ser considerado o padrão-ouro na genotipagem de bactérias do complexo *M. tuberculosis*, esse método possui algumas limitações, sendo as principais: necessariamente ser feito a partir da cultura, uma vez que precisa de uma grande quantidade de DNA genômico, custo relativamente alto e trabalhoso. Além disso, em cepas que possuem menos de seis sequências de inserção IS6110 o método tem baixo poder discriminatório (BURGOS; PYM, 2002; VARMA-BASIL et al., 2011).

O *spoligotyping* tem como fundamento a detecção de 43 espaçadores de 36 a 41 pb que estão entre as sequências de repetição direta (DR) na região também denominada DR do genoma de bactérias do complexo *M. tuberculosis* (GROENEN et al., 1993; KAMERBEEK et al., 1997). A região DR contém uma sequência IS6110 e acredita-se que essa seja a primeira IS6110 do genoma e, portanto, a que tenha dado origem às demais sequências IS6110 presentes no genoma das cepas de *M. tuberculosis* (PHILIPP et al., 1996). A sequência DR possui 36 pb e é bem conservada entre os isolados clínicos, mas os espaçadores não são conservados e são compartilhados por bactérias relacionadas epidemiologicamente. Com a utilização de um iniciador *forward* que hibridiza ao final de uma DR e um *reverse* que hibridiza no início da DR seguinte é possível amplificar esses espaçadores e detectá-los por hibridização reversa em uma membrana com oligonucleotídeos imobilizados complementares aos espaçadores. O padrão de presença ou ausência gera um código binário de 43 componentes que pode ser reduzido a um código octogonal com 15 números (DALE et al., 2001). A versão clássica do *spoligotyping* utiliza 43 espaçadores, mas alguns estudos que utilizam a detecção de 25 espaçadores adicionais, que aumentam o poder discriminatório do método (ZHANG et al., 2010). O *spoligotyping* é um método rápido, simples e robusto (KANDUMA;

MCHUGH; GILLESPIE, 2003). Além disso, como é feita uma PCR antes da hibridização, o método pode ser feito diretamente a partir da amostra clínica.

Por ter alta reprodutibilidade, há um banco mundial de cepas caracterizadas pelo *spoligotyping* contendo informações de mais de 100 mil cepas circulantes em 169 países. De acordo com o resultado do *spoligotyping* as cepas são enquadradas em famílias e subfamílias (COUVIN; ZOZIO; RASTOGI, 2017; DEMAY et al., 2012).

O DNA micobacteriano possui 41 unidades de repetição intercaladas (mycobacterial interspersed repeat units - MIRU), que possuem de 40 a 100 pb, porém as versões mais comuns utilizam 12, 15 ou 24 *loci*. A genotipagem baseada no MIRU caracteriza as estirpes de MTB pelo número de repetições de MIRUs independentes, utilizando uma PCR seguida de algum método de separação, como a eletroforese em gel ou a eletroforese capilar em sequenciador, para determinação do produto amplificado. O MIRU possui alto poder discriminatório e a possibilidade de automação na determinação do tamanho do produto amplificado (SUPPLY et al., 2000).

Embora o primeiro sequenciamento completo de uma cepa de *M. tuberculosis* tenha sido publicado em 1998, somente nos últimos anos houve um crescimento na utilização do sequenciamento de genoma completo e sua aplicação na rotina de laboratórios clínicos devido ao desenvolvimento e diminuição do custo das técnicas de sequenciamento de nova geração (AMLEROVA; BITAR; HRABAK, 2018). A grande vantagem desse método é que, além da aplicação de vários métodos simultâneos de genotipagem, ele também pode fornecer outras informações como a detecção molecular de resistência aos antimicrobianos e a confirmação da identificação da espécie (EI et al., 2016). O grande desafio é a padronização da análise de dados, que depende de profissionais com conhecimento na área de bioinformática (KOHL et al., 2014).

### **3 CAPÍTULO EXPERIMENTAL I – ESTUDO RETROSPECTIVO PARA AVALIAÇÃO DO TESTE COMERCIAL XPert® MTB/RIF E DA BACILOSCOPIA EM RELAÇÃO À CULTURA PARA DIAGNÓSTICO DA TB**

#### **3.1 OBJETIVOS**

##### **3.1.1 Objetivo Geral**

Realizar a avaliação clínica retrospectiva do teste Xpert® MTB/RIF e da baciloscopia em relação à cultura em amostras do HU-UFSC para o diagnóstico da TB

##### **3.1.2 Objetivos Específicos**

- Verificar a prevalência geral de TB pulmonar e extrapulmonar nas amostras dos pacientes do HU/UFSC
- Determinar a sensibilidade e especificidade da baciloscopia pelo método de Ziehl -Neelsen em comparação à cultura em meio sólido;
- Determinar a sensibilidade e especificidade do Xpert® MTB/RIF em amostras pulmonares e extrapulmonares com baciloscopia positiva e negativa em comparação à cultura em meio sólido;
- Verificar a sensibilidade e a especificidade da detecção da resistência à rifampicina pelo teste Xpert® MTB/RIF em comparação ao teste de sensibilidade MGIT.

#### **3.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

##### **3.2.1 Caracterização do estudo**

Trata-se de um estudo descritivo transversal retrospectivo. Foram utilizadas no estudo amostras pulmonares e extrapulmonares de pacientes com suspeita de TB internados, atendidos no ambulatório ou atendidos na emergência do HU-UFSC, recebidas no Setor de Microbiologia da Unidade de Análises Clínicas (LACL/HU) entre maio de 2015 e julho de 2016 e que foram processadas para cultura, baciloscopia e teste Xpert® MTB/RIF.

O HU-UFSC conta com uma estrutura de 202 leitos abertos divididos em Unidades de Internação Médicas I e II (42 leitos), Unidades de Internação Cirúrgicas I e II (60 leitos), Unidade de Alojamento Conjunto Mães e Gestantes (20 leitos), Unidade de Centro

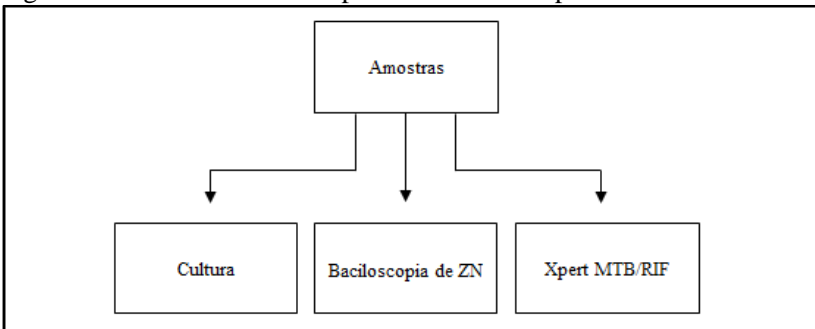
Obstétrico (5 leitos), Unidade de Cirurgia Obstétrica (6 leitos), Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (10 leitos), Unidade de Internação Pediátrica (20 leitos), Unidade de Emergência (27 leitos) e Unidade de Terapia Intensiva (12 leitos). A taxa média de ocupação dos leitos é de 78%. Além disso, no hospital são realizados em média 10.400 atendimentos de emergência por mês e 11.200 consultas ambulatoriais (HU, 2016a, 2016b, 2016c, 2016d, 2016e, 2016f).

### 3.2.2 Processamento das amostras

Para cada amostra recebida na LACL/HU o sistema de gerenciamento laboratorial atribui um número de identificação, que é utilizado para processá-la.

As amostras deste estudo foram mantidas em geladeira 2-8°C e processadas em até 24 horas para cultura e baciloscopia e em até 72 horas para o Xpert® MTB/RIF, conforme a Figura 4.

Figura 4 - Fluxo das amostras pulmonares e extrapulmonares no CP-I



Fonte: o autor.

Amostras líquidas pulmonares (aspirado brônquico, lavado brônquico e lavado broncoalveolar) e extrapulmonares (líquido cefalorraquidiano, líquido pleural e outros líquidos) com volume superior a 2 mL foram centrifugadas a 2.000g por 5 minutos, descartando-se posteriormente o sobrenadante e deixando cerca de 0,8 mL para os testes. Quando possível, nas amostras de escarro foi selecionada a parte mais purulenta.

### 3.2.3 Critérios de exclusão da análise de dados

Amostras que, por algum motivo, não foram processadas para a cultura ou amostras com resultado de contaminação foram excluídas da análise do estudo. Além disso, amostras com resultados inválidos no Xpert® MTB/RIF e que não puderam ser repetidas e amostras não processadas na baciloscopia foram excluídas.

### 3.2.4 Xpert® MTB/RIF

A metodologia seguiu as instruções do fabricante. Uma porção de amostra (geralmente a porção mais purulenta, no caso das amostras pulmonares) foi transferida para um tubo com fundo cônico de 15 mL. Em seguida, foi adicionado o reagente SR (*sample reagent*) em uma proporção de duas partes de SR para uma parte de amostra. Nas amostras centrifugadas, foram utilizados 0,5 mL de amostra e 1,5 mL de reagente SR, seguindo a proporção indicada pelo fabricante do kit (três partes de SR para uma parte de amostra).

O tubo com fundo cônico e tampa de rosca foi agitado em vórtex por 10 segundos e deixado em repouso. Após 10 minutos, o tubo foi novamente agitado em vórtex e deixado em repouso por 5 minutos. Após esse tempo, transferiu-se 2 mL do conteúdo do tubo com fundo cônico para o local indicado para amostra no cartucho Xpert® MTB/RIF. O cartucho foi cadastrado e adicionado no equipamento GeneXpert e iniciou-se o teste com a utilização do software próprio do equipamento.

Após o termino da reação, o aparelho fornece os resultados semiquantitativos, baseados na média dos ciclos de detecção de cada uma das sondas, conforme Quadro 1. O software do teste denomina o ciclo de detecção como Ct (*cycle threshold*), mas atualmente a denominação mais aceita e adotada no presente trabalho é ciclo de quantificação (Cq) (BUSTIN et al., 2009).

Quadro 1 - Interpretação do resultado semiquantitativo de acordo com a média dos Cq de detecção das sondas positivas.

Média dos Cq	Resultado Xpert® MTB/RIF
—	Não detectado
≥ 29,0	Detectado <i>very low</i>
22,0-28,9	Detectado <i>low</i>
16,0-21,9	Detectado <i>medium</i>
< 16,0	Detectado <i>high</i>

Legenda: Cq: ciclo de quantificação

Fonte: o autor

### 3.2.5 Cultura

A cultura foi feita com os métodos de O-K ou L-J, de acordo com o tipo de amostra, seguindo o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da TB e outras Micobactérias (BRASIL, 2008).

#### 3.2.5.1 Amostras pulmonares

Amostras de escarro espontâneo ou induzido, secreção traqueal, aspirado brônquico, lavado brônquico e lavado bronco-alveolar foram submetidas ao método de Ogawa-Kudoh, seguindo as instruções do fabricante (Laborclin, Brasil).

O *swab* estéril fornecido junto ao kit foi mergulhado na amostra para a aderência do material biológico e, em seguida, mergulhado em 5 mL de descontaminante (NaOH 4%). Após 2 minutos, o excesso de líquido foi retirado girando-se o *swab* contra a parede do tubo e, para a semeadura da amostra, o material retido no *swab* foi semeado por estriamento na superfície de dois tubos de meio de cultura Ogawa-Kudoh.

Os tubos foram incubados a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com leituras semanais por até 8 semanas e, em caso de crescimento de colônias típicas de bactérias do CMTB, os resultados foram registrados conforme o Quadro 2. Na análise macroscópica, colônias típicas do CMTB apresentam coloração creme sem pigmentos, aspecto seco e rugoso semelhante a couve-flor.

Quadro 2 - Interpretação dos resultados da cultura conforme o crescimento das colônias

<b>Resultado</b>	<b>Interpretação</b>
Reportado o número de colônias	1-20 colônias
+	21-100 colônias
++	Mais de 100 colônias separadas
+++	Colônias confluentes

Fonte: adaptado de BRASIL, 2008.

### 3.2.5.2 Amostras extrapulmonares

Amostras extrapulmonares de sítios estéreis (líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, outros líquidos e aspirado de linfonodo) foram semeadas em meio de L-J. Com auxílio de uma micropipeta, 100 µL da amostra foram semeadas diretamente em cada um de dois tubos contendo o meio de cultura sólido.

Amostras extrapulmonares de tecidos estéreis foram finamente divididas com auxílio de bisturi e semeadas em L-J.

Os tubos de L-J foram incubados e a leitura foi realizada conforme descrito no item 3.2.5.1.

### 3.2.6 Teste de sensibilidade

Após crescimento de micobactérias nos meios de cultura, os isolados foram enviados para o Setor de TB do Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC) para confirmação da identificação e testes de sensibilidade aos antimicrobianos de primeira linha (isoniazida, rifampicina, etambutol e estreptomina). O LACEN/SC é o laboratório de referência estadual em saúde pública no estado de Santa Catarina e utiliza o método de cultura líquida BACTEC-960 MGIT (BD, EUA) para a confirmação da identificação e para o teste de sensibilidade.

No Setor de TB, os isolados foram diluídos em meio Middlebrook 7H9 modificado BBL (BD, EUA), agitados com pérolas estéreis em vórtex por alguns segundos até obtenção de uma suspensão homogênea de bactérias com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala McFarland. A suspensão foi diluída 1:5 com solução salina estéril e 0,5 mL foram semeados em cada um dos seguintes tubos: 1) MGIT sem

nenhum antimicrobiano (controle de crescimento), 2) MGIT contendo 0,1 µg/mL de isoniazida, 3) MGIT contendo 1,0 µg/mL de rifampicina, 4) MGIT contendo 5,0 µg/mL de etambutol, 5) MGIT contendo 1,0 µg/mL de estreptomicina e 6) MGIT contendo 500 µg/mL de PNB (ácido *p*-nitrobenzóico). O tubo contendo PNB é utilizado como controle de bactérias do CMTB, uma vez que as espécies do complexo são sensíveis ao PNB.

Os tubos foram incubados no equipamento BACTEC MGIT 960 (BD, EUA) e o resultado dos meios de cultura contendo isoniazida, rifampicina, etambutol e estreptomicina foram comparados com o tubo de controle de crescimento pelo software do equipamento para emissão do resultado do teste de sensibilidade.

Para confirmação da identificação, também foi preparada uma lâmina e corada pelo método de Ziehl-Neelsen para verificação da álcool-ácido resistência e fator corda.

### **3.2.7 Baciloscopia**

Para a baciloscopia, foi confeccionado um esfregaço em uma lâmina, que foi fixado pelo calor. As lâminas foram coradas pelo método de Ziehl-Neelsen, conforme o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da TB e outras Micobactérias (BRASIL, 2008). Primeiramente, adicionou-se fucsina fenicada sobre a lâmina e, com auxílio de uma pinça com algodão com fogo na sua ponta, passou-se algumas vezes sob a lâmina até ver a emissão de vapor e sem deixar o reagente ferver. Esse procedimento foi repetido duas vezes em 5 minutos. Após esse tempo, a lâmina foi lavada em água corrente e descorada com solução de álcool-ácido por 1-3 minutos até que o esfregaço adquirisse coloração esbranquiçada ou levemente rosada. As lâminas foram novamente lavadas com água corrente e adicionou-se azul de metileno por 1 minuto para a coloração de fundo.

A leitura foi realizada em microscópio óptico comum na objetiva de imersão. Nas amostras pulmonares, os resultados positivos foram semiquantificados em até três cruces, conforme o Quadro 3.



Quadro 3 - Interpretação do resultado da baciloscopia conforme o número de bacilos observados

Resultado	Interpretação
Reportado o número de bacilos	1-9 bacilos em 100 campos observados
+	10-99 bacilos em 100 campos observados
++	1 a 10 bacilos por campo nos primeiros 50 campos observados
+++	Mais de 10 bacilos por campo nos primeiros 20 campos observados

Fonte: adaptado de BRASIL, 2008.

### 3.2.8 Coleta e análise dos dados

Os resultados de cultura, baciloscopia e teste de sensibilidade aos antimicrobianos foram obtidos no sistema de gerenciamento laboratorial do LACL/HU. Amostras consecutivas do mesmo paciente que não foram cadastradas com o mesmo número foram analisadas de forma independente.

Para verificação da acurácia da baciloscopia e do Xpert® MTB/RIF, foram calculadas a sensibilidade (*sensibilidade clínica* =  $\frac{VP}{VP+FN}$ , sendo VP: verdadeiro positivo e FN: falso negativo) e especificidade (*especificidade clínica* =  $\frac{VN}{VN+FP}$ , sendo VN: verdadeiro negativo e FP: falso positivo) em comparação ao padrão-ouro, a cultura. O intervalo de confiança (95%) foi calculado pela metodologia de Clopper-Pearson, utilizando-se o software estatístico MedCalc ([https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)).

### 3.2.9 Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEPSH-UDESC) com o CAAE n° 41836814.3.0000.0118.

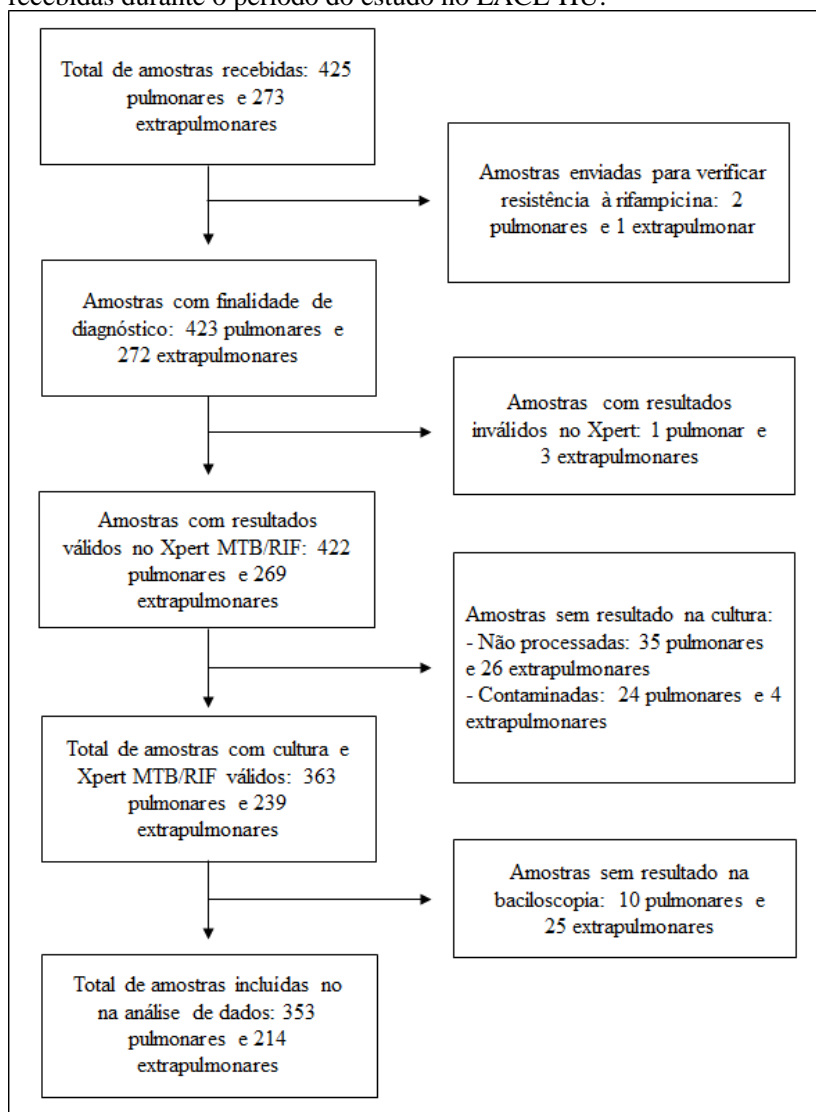
Nessa etapa do estudo não foram pesquisados ou incluídos dados dos pacientes, apenas os resultados laboratoriais das amostras clínicas.

### 3.3 RESULTADOS

Durante o período do estudo, foram recebidas 698 amostras que foram processadas no Xpert® MTB/RIF, sendo 425 pulmonares e 273 extrapulmonares.

Três amostras foram enviadas com finalidade de detecção de resistência e, portanto, excluídas. Em quatro amostras (três pulmonares e uma extrapulmonar), não foi possível obtenção do resultado do Xpert® MTB/RIF porque o teste foi inválido e não havia amostra suficiente para repetição (0,2% e 1,1% de resultados não interpretáveis, respectivamente). Além disso, 61 amostras não foram processadas pela cultura. Vinte e quatro entre as 387 amostras pulmonares e quatro entre as 243 amostras extrapulmonares apresentaram contaminação que inviabilizou a leitura do crescimento. Em 10 amostras pulmonares e 25 extrapulmonares não foi realizada a baciloscopia. Assim, foram incluídas no estudo 567 amostras, sendo 353 pulmonares e 214 extrapulmonares (Figura 5).

Figura 5 - Fluxograma das amostras pulmonares e extrapulmonares recebidas durante o período do estudo no LACL-HU.



Fonte: o autor.

### 3.3.1 Amostras pulmonares

Entre as 353 amostras pulmonares recebidas e incluídas no estudo (processamento no Xpert® MTB/RIF com resultados de cultura, Xpert® MTB/RIF e baciloscopia válidos), 270 eram de escarro (76,5%) e 16 eram secreção traqueal (4,5%). As demais amostras (aspirado brônquico, lavado brônquico e lavado broncoalveolar), coletadas por broncoscopia, representaram 19,0% do total de amostras recebidas (Tabela 2).

Tabela 2 - Amostras pulmonares com resultados válidos na cultura, Xpert® MTB/RIF e baciloscopia incluídas no CE-I.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Número total de amostras (%)</b>	<b>Número de amostras positivas na cultura (%)</b>
Escarro	270 (76,5)	36 (83,7)
Aspirado brônquico	27 (7,6)	3 (7,0)
Lavado brônquico	23 (6,5)	—
Lavado broncoalveolar	17 (4,8)	1 (2,3)
Secreção traqueal	16 (4,5)	3 (7,0)
<b>Total</b>	<b>353 (100,0)</b>	<b>43 (100,0)</b>

Fonte: o autor.

Na cultura, uma amostra foi positiva para *M. xenopii* e 43 foram positivas para *M. tuberculosis*, resultando em uma positividade de 12,2% para *M. tuberculosis* entre as amostras com resultados válidos (43/353).

A baciloscopia apresentou sensibilidade de 67,4% (IC95 51,5-80,9%) e especificidade de 99,4% (IC95 97,7-100,0%) nas amostras pulmonares. Em relação aos grupos de amostras, a sensibilidade e especificidade da baciloscopia foram, respectivamente, 69,2% (IC95 52,4-83,0%) e 100,0% (IC95 97,8-100,0%) para amostras espontâneas e 50% (IC95 6,8-93,2%) e 100,0% (IC95 94,0-100,0%) para amostras coletadas por broncoscopia (Tabela 3).

Tabela 3 - Sensibilidade e especificidade clínicas da baciloscopia em amostras pulmonares recebidas no CE-I utilizando como padrão-ouro a cultura.

<b>Amostra</b>	<b>VP</b>	<b>FP</b>	<b>FN</b>	<b>VN</b>	<b>Sensibilidade (IC95)</b>	<b>Especificidade (IC95)</b>
Escarro	26	1	10	233	72,2 (54,8-85,8)	99,6 (97,6-100,0)
ST	1	0	2	13	33,3 (0,8-90,6)	100,0 (75,3-100,0)
AB	1	1	2	23	33,3 (0,8-90,6)	95,8 (78,9-99,9)
LB	0	0	0	23	*	100,0 (85,1-100,0)
LBA	1	0	0	16	100,0 (2,5-100,0)	100,0 (79,4-100,0)
Escarro + ST	27	1	12	246	69,2 (52,4-83,0)	99,6 (97,8-100,0)
AB + LB + LBA	2	0	2	62	50,0 (6,8-93,2)	100,0 (94,2-100,0)
Total	29	2	14	308	67,4 (51,5-80,9)	99,4 (97,7-100,0)

Legenda: AB: aspirado brônquico; LB: lavado brônquico; LBA: lavado bronco-alveolar; ST: secreção traqueal; VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VN: verdadeiro-negativo. \*: não foi possível calcular.

Fonte: o autor.

Já o teste Xpert® MTB/RIF apresentou sensibilidade de 95,4% (IC95 84,2-99,4%) e especificidade de 96,5% (IC95 93,7-98,2%) para as amostras pulmonares em geral (Tabela 6). Nas amostras coletadas por broncoscopia, o Xpert® MTB/RIF apresentou sensibilidade de 75,0% (IC95 19,4-99,4%) e especificidade de 98,4% (IC95 91,5-100,0%).

Tabela 4 - Sensibilidade e especificidade clínicas do teste Xpert® MTB/RIF em amostras pulmonares no CE-I utilizando como padrão-ouro a cultura.

<b>Amostra</b>	<b>VP</b>	<b>FP</b>	<b>FN</b>	<b>VN</b>	<b>Sensibilidade (IC95)</b>	<b>Especificidade (IC95)</b>
Escarro	35	7	1	227	92,2 (85,5-99,9)	97,0 (93,9-98,8)
ST	3	3	0	10	100,0 (29,2-100,0)	76,9 (46,1-95,0)
AB	2	1	1	23	66,7 (9,4-99,2)	95,8 (78,9-99,9)
LB	0	0	0	23	*	100,0 (85,2-100,0)
LBA	1	0	0	16	100,0 (2,5-100,0)	100,0 (79,4-100,0)
Escarro + ST	38	10	1	237	96,8 (83,3-99,9)	96,0 (92,7-98,0)
AB + LB + LBA	3	1	1	62	75,0 (19,4-99,4)	98,4 (91,5-100,0)
Total	41	11	2	299	95,4 (84,2-99,4)	96,5 (93,7-98,2)

Legenda: AB: aspirado brônquico; LB: lavado brônquico; LBA: lavado bronco-alveolar; ST: secreção traqueal; VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VN: verdadeiro-negativo.

Fonte: o autor.

O teste Xpert® MTB/RIF apresentou sensibilidade e especificidade próximas nas amostras com baciloscopia positiva e negativa, conforme pode ser observado na tabela 7.

Tabela 5 - Sensibilidade e especificidade clínicas do teste Xpert® MTB/RIF de acordo com o perfil da baciloscopia das amostras pulmonares incluídas no CE-I

<b>Baciloscopia</b>	<b>VP</b>	<b>FP</b>	<b>FN</b>	<b>VN</b>	<b>Sensibilidade (IC95)</b>	<b>Especificidade (IC95)</b>
Positiva	28	0	1	2	96,6 (82,2-99,9)	100,0 (15,8-100,0)
Negativa	13	11	1	297	92,9 (66,1-99,8)	96,4 (93,7-98,2)

Legenda: VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VN: verdadeiro-negativo.

Fonte: o autor.

Na estratificação das amostras por meio dos resultados semiquantitativos da cultura, a sensibilidade da baciloscopia foi de

100,0% apenas para amostras com três cruces na cultura e do Xpert® MTB/RIF foi de 100,0% para amostras com uma, duas ou três cruces (Tabela 6).

Tabela 6 - Sensibilidade clínica do Xpert® MTB/RIF e da baciloscopia de acordo com o número de cruces da cultura das amostras pulmonares incluídas no CE-I.

Cultura	Baciloscopia			Xpert® MTB/RIF		
	VP	FN	Sensibilidade (95% IC)	VP	FN	Sensibilidade (95% IC)
1-20 UFC	3	11	21,4 (4,7-50,8)	12	2	85,7 (57,2-98,2)
+	6	2	75,0 (34,9-96,8)	8	0	100,0 (63,1-100,0)
++	4	1	80,0 (28,4-99,5)	5	0	100,0 (47,8-100,0)
+++	12	0	100,0 (73,5-100,0)	12	0	100,0 (73,5-100,0)
Sem cruces	4	0	100,0 (39,8-100,0)	4	0	100,0 (39,8-100,0)

Legenda: Sem cruces: quatro amostras não tinham o resultado semiquantitativo da cultura; VP: verdadeiro-positivo; FN: falso-negativo.

Fonte: o autor.

Uma vez que a especificidade clínica do teste Xpert® MTB/RIF foi menor do que a da baciloscopia nas amostras pulmonares, foram analisados os valores preditivos positivos do teste estratificando-se as amostras de acordo com o resultado semiquantitativo. Para resultados *very low*, o VPP foi de 28,6%. Já para resultados *low* o VPP aumentou para 92,9% e nas amostras com resultados *médium* e *high* foi de 100,0% (Tabela 7).

Na tabela 7 também é possível observar que a baciloscopia detectou 1/4 casos de resultado *very low* no Xpert® MTB/RIF, 5/13 casos de resultado *low*, 17/19 casos de resultado *médium* e todos os casos (5/5) de resultado *high*.

Tabela 7 - Valor Preditivo Positivo (VPP) do teste Xpert® MTB/RIF e detecção da baciloscopia de acordo com o resultado semiquantitativo das amostras pulmonares incluídas no CE-I

Ciclo correspondente	Número de amostras	Resultado em comparação à cultura		
		VP Xpert (BAAR +)	FP Xpert (BAAR +)	VPP Xpert
<i>Very low</i>	14	4 (1)	10 (0)	28,6
<i>Low</i>	14	13 (5)	1 (0)	92,9
<i>Medium</i>	19	19 (17)	0	100,0
<i>High</i>	5	5 (5)	0	100,0

Legenda: VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; VPP: valor preditivo positivo; BAAR +: baciloscopia positiva; BAAR -: baciloscopia negativa.

Fonte: o autor.

### 3.3.2 Amostras extrapulmonares

As principais amostras extrapulmonares recebidas foram líquido cefalorraquidiano (107), líquido pleural (63), tecidos em geral (14) e líquido ascítico (12). As demais amostras recebidas (18) eram diversos outros materiais clínicos, como sangue e lavado gástrico (Tabela 8).



Tabela 8 - Amostras extrapulmonares com resultados válidos na cultura, Xpert® MTB/RIF e baciloscopia incluídas no CE-I.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Número total de amostras (%)</b>	<b>Número de amostras positivas na cultura (%)</b>
Líquido cefalorraquidiano	107 (50,0)	1 (12,5)
Líquido pleural	63 (29,4)	6 (75,0)
Tecidos	14 (6,5)	1 (12,5)
Líquido ascítico	12 (5,6)	—
Aspirado de medula óssea	3 (1,4)	—
Aspirado linfonodo	3 (1,4)	—
Secreção purulenta	2 (0,9)	—
Lavado gástrico	2 (0,9)	—
Líquido sinovial	2 (0,9)	—
Sangue	1 (0,5)	—
Líquido pericárdico	1 (0,5)	—
Abcesso hepático	1 (0,5)	—
Líquido de massa abdominal	1 (0,5)	—
Seroma de mama	1 (0,5)	—
Líquido não identificado	1 (0,5)	—
<b>Total</b>	<b>214 (100,0)</b>	<b>8 (100,0)</b>

Entre as 243 amostras semeadas na cultura, quatro apresentaram contaminação, resultando em um índice de contaminação de 1,6%. A positividade entre as amostras válidas, ou seja, com resultados válidos de cultura, baciloscopia e Xpert® MTB/RIF, foi de 3,7% (8/214). A maior parte das amostras extrapulmonares positivas era líquido pleural (6 amostras). Também foram positivas uma amostra de LCR e uma amostra de tecido.

A baciloscopia não detectou bacilos álcool-ácido resistentes, nas 214 amostras, tanto nas 206 amostras negativas na cultura, quanto nas oito amostras positivas (Tabela 9).

Tabela 9 - Sensibilidade e especificidade clínicas da baciloscopia em amostras extrapulmonares incluídas no CE-I utilizando como padrão-ouro a cultura.

Amostra	VP	FP	FN	VN	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)
LCR	0	0	1	106	0,0 (0,0-97,5)	100,0 (96,6-100,0)
LQP	0	0	6	57	0,0 (0,0-45,9)	100,0 (93,7-100,0)
Tecidos	0	0	1	13	0,0 (0,0-97,5)	100,0 (75,3-100,0)
LQA	0	0	0	12	*	100,0 (73,5-100,0)
AMO	0	0	0	3	*	100,0 (29,2-100,0)
AL	0	0	0	3	*	100,0 (29,2-100,0)
Outros	0	0	0	12	*	100,0 (73,5-100,0)
Total	0	0	8	206	0,0 (0,0-36,9)	100,0 (98,2-100,0)

Legenda: LCR: líquido cefalorraquidiano; LQP: líquido pleural; LQA: Líquido ascítico; AMO: aspirado de medula óssea; AL: aspirado de linfonodo; VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VN: verdadeiro-negativo. \*: não foi possível calcular.

Fonte: o autor.

No teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF seis amostras foram positivas, sendo três resultados verdadeiros positivos e três falsos positivos em relação ao padrão-ouro, a cultura. A sensibilidade do teste para amostras extrapulmonares foi de 37,5% (IC95 8,5-75,5%) e a especificidade foi de 98,5% (IC95 95,8-99,7%) (Tabela 10).

Tabela 10 - Sensibilidade e especificidade clínicas do teste Xpert® MTB/RIF em amostras extrapulmonares incluídas no CE-I utilizando como padrão-ouro a cultura.

Amostra	VP	FP	FN	VN	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)
LCR	1	3	0	103	100,0 (2,5-100,0)	97,2 (92,0-99,4)
LQP	2	0	4	57	33,3 (4,3-77,7)	100,0 (93,7-100,0)
Tecidos	0	0	1	13	0,0 (0,0-97,5)	100,0 (75,3-100,0)
LQA	0	0	0	12	*	100,0 (73,5-100,0)
AMO	0	0	0	3	*	100,0 (29,2-100,0)
AL	0	0	0	3	*	100,0 (29,2-100,0)
Outros	0	0	0	12	*	100,0 (73,5-100,0)
Total	3	3	5	203	37,5 (8,5-75,5)	98,5 (95,8-99,7)

Legenda: LCR: líquido cefalorraquidiano; LQP: líquido pleural; LQA: Líquido ascítico; AMO: aspirado de medula óssea; AL: aspirado de linfonodo; VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VN: verdadeiro-negativo. \*: não foi possível calcular.

Fonte: o autor.

Fez-se uma análise da sensibilidade clínica da baciloscopia e do Xpert® MTB/RIF de acordo com o resultado semiquantitativo da cultura. Observou-se que para o teste Xpert® MTB/RIF a sensibilidade foi menor nas amostras com 1-20 UFC do que na amostra com duas cruzes (Tabela 11). Porém, poucas amostras foram positivas, o que torna o intervalo de confiança extremamente abrangente.

Tabela 11 - Sensibilidade clínica em amostras acordo com o número de cruzes da cultura extrapulmonares incluídas no CE-I da baciloscopia e do Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF de acordo com o número de cruzes da cultura

Cultura	Baciloscopia			Xpert <sup>®</sup> MTB/RIF		
	VP	FN	Sensibilidade (95% IC)	VP	FN	Sensibilidade (95% IC)
1-20 UFC	0	7	0,0 (0,0-41,0)	2	5	28,6 (3,7-71,0)
+	-	-	-	-	-	-
++	0	1	0,0 (0,0-97,5)	1	0	100,0 (2,5-100,0)
+++	-	-	-	-	-	-

Legenda: VP: verdadeiro-positivo; FN: falso-negativo; UFC: unidade formadora de colônia.

Fonte: o autor.

Não houve diferença entre o VPP das amostras que tiveram o resultado *very low* e *low* no teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF, conforme pode ser observado na tabela 12.

Tabela 12 - Valor Preditivo Positivo em amostras extrapulmonares incluídas no CE-I do teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF de acordo com o resultado semiquantitativo da metodologia

Ciclo correspondente	Resultado em comparação à cultura		
	VP	FP	VPP
<i>Very low</i>	1	1	50,0
<i>Low</i>	2	2	50,0
<i>Medium</i>	0	0	-
<i>High</i>	0	0	-

Legenda: VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VN: verdadeiro-negativo.

Fonte: o autor.

### 3.3.3 Resistência à rifampicina

Entre as 58 amostras (pulmonares e extrapulmonares) detectadas no Xpert® MTB/RIF e com resultados válidos na cultura, 44 amostras foram positivas na cultura, sendo apenas uma multirresistente no TSA (2,3%). A multirresistência é definida como a resistência à isoniazida e à rifampicina (MDR – *multidrug resistant*). Seis amostras foram excluídas, sendo que em três a bactéria não estava viável para o antibiograma e em outras três o resultado da resistência à rifampicina no Xpert® MTB/RIF foi indeterminado devido à baixa carga bacilar. Duas amostras apresentaram resultado detectado para a resistência à rifampicina, sendo uma MDR e a outra sensível a todos os antimicrobianos testados (Tabela 15).

Tabela 13 - Resultados de sensibilidade e especificidade da utilização do Xpert® MTB/RIF na detecção de resistência à rifampicina em relação ao TSA no CE-I.

Amostra	VP	FP	FN	VN	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)
Escarro	0	0	0	38	*	100,0 (90,8-100,0)
ST	0	0	0	5	*	100,0 (47,8-100,0)
AB	1	0	0	1	100,0 (2,5-100,0)	100,0 (2,5-100,0)
LBA	0	1	0	0	*	0,0 (0,0-97,5)
LCR	0	0	0	4	*	100,0 (39,8-1,00)
LQP	0	0	0	2	*	100,0 (15,8-1,00)
Total	1	1	0	50	100,0 (2,5-100,0)	98,0 (89,6-100,0)

Legenda: AB: aspirado brônquico; LBA: lavado bronco-alveolar; ST: secreção traqueal; LCR: líquido cefalorraquidiano; LQP: líquido pleural; VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VN: verdadeiro-negativo. \*: não foi possível calcular.

Fonte: o autor.

### 3.3.4 Sumário dos resultados do CE-I

Os principais resultados obtidos no CE-I foram:

- A sensibilidade e a especificidade da baciloscopia no CE-I (sem acesso ao histórico de TB dos pacientes) foram de 67,4% (IC95 51,5-80,9%) e 99,4% (IC95 97,7-100,0%) em amostras pulmonares e 0,0% (IC95 0,0-36,9%) e 100,0% (IC95 98,2-100,0%) em amostras extrapulmonares;

- No teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF, a sensibilidade e a especificidade no CE-I foram de 95,4% (IC95 84,2-99,4%) e 96,5% (IC95 93,7-98,2%) em amostras pulmonares e 37,5% (IC95 8,5-75,5%) e 98,5% (IC95 95,8-99,7%) em amostras extrapulmonares. Em amostras pulmonares, o teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF teve sensibilidade e especificidade semelhantes em amostras com baciloscopia positiva (96,6%; IC95 82,2-99,9% e 100,0%; IC95 15,8-100,0) e negativa (92,9%; IC95 66,1-99,8% e 96,4%; IC95 93,7-98,2%);

- No CE-I, em duas amostras foi detectada a resistência à rifampicina no teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF, sendo um resultado verdadeiro-positivo e um resultado falso-positivo.

## 4 CAPÍTULO EXPERIMENTAL II – ESTUDO PROSPECTIVO PARA AVALIAÇÃO DO TESTE COMERCIAL XPert® MTB/RIF E DA BACILOSCOPIA EM RELAÇÃO À CULTURA SÓLIDA e líquida PARA DIAGNÓSTICO DA TB E APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR A PARTIR DE RESTOS<sup>1</sup> DE REAÇÃO DO TESTE XPert® MTB/RIF

### 4.1 OBJETIVOS

#### 4.1.1 Objetivo Geral

Realizar a avaliação clínica prospectiva do teste Xpert® MTB/RIF e da baciloscopia em relação à cultura sólida e cultura líquida e baciloscopia para o diagnóstico da TB em amostras do HU-UFSC, bem como aplicar metodologias para avaliar a epidemiologia molecular diretamente a partir dos restos de reação do teste Xpert® MTB/RIF.

#### 4.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a sensibilidade e especificidade da baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen;
- Determinar a sensibilidade e especificidade do Xpert® MTB/RIF em todas as amostras e entre as amostras com baciloscopia positiva e negativa;
- Verificar sensibilidade e especificidade da detecção da resistência à rifampicina pelo teste Xpert® MTB/RIF em relação ao teste de sensibilidade no MGIT;
- Padronizar no laboratório a descontaminação/concentração em amostras pulmonares e extrapulmonares não estéreis para cultura de *M. tuberculosis*;
- Comparar a cultura sólida e a cultura líquida manual na detecção do crescimento de *M. tuberculosis*;
- Determinar os perfis de *spoligotyping* e MIRU 15-loci (MIRU-15) a partir dos restos de reação do teste Xpert® MTB/RIF e dos isolados clínicos;

---

<sup>1</sup> A expressão restos de reação do teste Xpert® MTB/RIF significa a mistura de reagentes, reação *semi-nested* e DNA genômico. O DNA genômico de *M. tuberculosis* é o alvo de interesse na utilização deste material.

- Comparar o ciclo de amplificação no teste Xpert® MTB/RIF e o sucesso na amplificação do MIRU-15 e na determinação do *spoligotyping*;
- Fazer o dendrograma filogenético para observar a formação de *clusters*

## 4.2 METODOLOGIA

### 4.2.1 Caracterização do estudo e recrutamento dos pacientes

A segunda etapa é um estudo descritivo transversal prospectivo com amostras também do Hospital Universitário, mas recebidas entre maio de 2017 e maio de 2018. Quando uma amostra com solicitação de exames para diagnóstico de TB (cultura para micobactérias, baciloscopia e/ou teste rápido molecular – Xpert® MTB/RIF) era recebida no setor de Microbiologia da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas do HU (LACL/HU), os pacientes atendidos no ambulatório, na emergência ou internados no hospital maiores de 12 anos eram localizados, convidados a participar do estudo e, quando aceitaram, responderam a um questionário (aproximadamente 10 minutos) e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE; anexo I). Quando algum paciente não foi localizado (transferido e/ou alta antes do contato), foram realizadas três tentativas de contato por telefone em dias diferentes. Caso aceitassem, combinou-se um horário para entrevista e entrega do TCLE.

No caso de adolescentes entre 12 e 17 anos ou de pacientes que não estavam aptos a assinar o TCLE, o convite para participação foi feito aos pais e/ou responsáveis, que assinaram o TCLE para dependente. Ainda assim, o adolescente foi informado do estudo e, quando concordou em participar, assinou o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) (anexo II).

### 4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do CE-II pacientes cuja amostra era insuficiente para todos os testes, amostras de pacientes menores de 12 anos, amostras que não tinham resultado da baciloscopia ou das culturas sólida ou líquida e amostras de pacientes que receberam antimicrobianos antituberculose no mês anterior à coleta da amostra encaminhada para o LACL/HU.

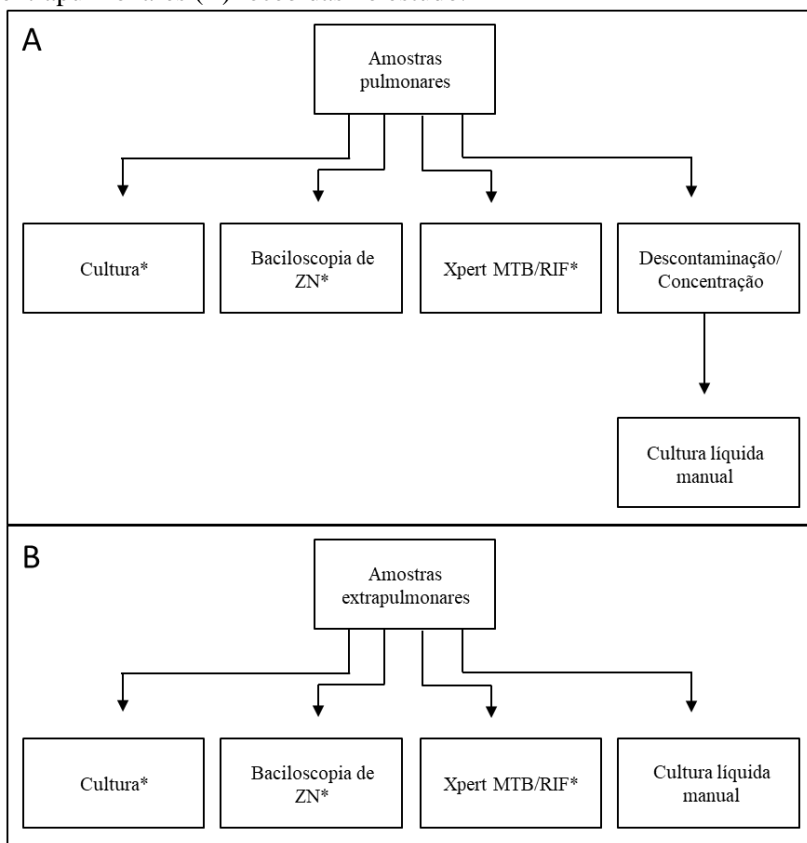


Amostras extrapulmonares diferentes de líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, biópsia pulmonar, urina, linfonodo ou aspirado de medula óssea também foram excluídas do estudo.

#### 4.2.3 Processamento das amostras

As amostras recebidas foram mantidas em geladeira 2-8°C até o momento do processamento, que consta na figura 6.

Figura 6 - Processamento das amostras pulmonares (A) e extrapulmonares (B) recebidas no estudo.



Legenda: \*: métodos já incorporados à rotina do setor de microbiologia da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas.

Fonte: o autor

O Xpert® MTB/RIF, a cultura em meio sólido e a baciloscopia foram processadas da mesma forma que na parte I do estudo. Porém, na parte II foram incluídas a descontaminação e concentração das amostras pelo método de NALC-NaOH e, a partir da amostra descontaminada, foi feita a cultura líquida manual.

#### **4.2.4 Descontaminação e concentração pelo método de NALC-NaOH**

Para descontaminação, o volume disponível da amostra clínica (até 10 mL) foi misturado com o mesmo volume de NALC/NaOH/citrato de sódio (concentração final 0,25%/1%/0,7%, respectivamente) em um tubo de fundo cônico com tampa de 50 mL. A mistura foi agitada em vórtex por alguns segundos e mantida em temperatura ambiente. Após 15 minutos, foi adicionado tampão fosfato 0,067 M pH 6,8 até a marca de 45 mL para neutralizar o ambiente alcalino. O tubo foi centrifugado a 3.000 g na temperatura de 6°C por 15 minutos para concentrar os bacilos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso com 1,3 mL de tampão fosfato pH 6,8, resultando em um volume de aproximadamente 1,5 mL.

Uma vez que o método não é utilizado na rotina laboratorial do Setor de Microbiologia do LACL/HU, foram utilizadas 20 amostras pulmonares para verificar o desempenho do método e comparar com os resultados das amostras processadas diretamente. Uma amostra de escarro sabidamente negativa (recebida para cultura de germes comuns) foi contaminada com aproximadamente  $10^3$  UFC/mL e processada pelo método como um controle positivo. Uma porção das amostras foi processada diretamente pelo método de Ogawa-Kudoh (Laborclin, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante e a outra porção foi descontaminada e semeada em meio de Lowenstein-Jensen.

#### **4.2.5 Cultura líquida manual**

O meio 7H9 foi preparado conforme indicado pelo fabricante (Difco BBL, EUA), autoclavado e adicionado de 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) esterilizado por filtração. O meio 7H9-OADC foi distribuído em alíquotas de 5,0 mL em tubos estéreis do tipo Falcon de propileno de 15 mL com fundo cônico e tampa de rosca. No momento da semeadura de cada amostra, foram adicionados 100 µL da mistura de antimicrobianos PANTA liofilizado após reconstituição com 3 mL de água purificada estéril (polimixina B 6.000 unidades/3

mL, anfotericina B 600 µg/3 mL, ácido nalidíxico 2.400 µg/3 mL, trimetoprim 600 µg/3 mL e azlocilina 600 µg/3 mL; BD, EUA). O controle de qualidade qualitativo de cada lote de meio de cultura preparado foi feito com uma cultura de *M. tuberculosis* H37Rv como controle positivo e uma cultura sem nenhum inóculo como controle de esterilidade.

Após descontaminação de amostras pulmonares e extrapulmonares não estéreis ou separação de alíquota de amostras extrapulmonares estéreis, foram inoculados 200 µL no meio 7H9-OADC-PANTA. Em cada conjunto de amostras processadas era incluído um controle negativo do processo completo (descontaminação e concentração pelo método do NALC/NaOH e cultura líquida) e, pelo menos uma vez por semana, era incluído um controle positivo com uma suspensão de *M. tuberculosis* H47Rv.

Assim como nos meios sólidos, a incubação foi realizada em estufa a 36±1°C. A leitura foi feita semanalmente, observando o aparecimento de pequenos grumos sedimentados. Quando isso aconteceu, uma gota do meio com grumo foi colocada em uma lâmina que após secagem foi corada pelo método de ZN para observar a presença de álcool-ácido resistência e do fator corda e, quando havia bacilos com essas características, semeou-se em meio sólido para isolamento da colônia.

#### 4.2.6 Análise dos dados

As informações clínicas e epidemiológicas (TB prévia, idade, sexo, local de residência, sítio anatômico da suspeita da infecção, tipo de entrada do caso, institucionalização, status sorológico HIV e outras comorbidades) foram coletadas por meio do questionário e dos prontuários dos pacientes.

Para as análises de associação entre as informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes foi feito o teste Qui-Quadrado de Pearson utilizando o software Excel (Microsoft, EUA). Foram considerados estatisticamente significativas associações com valor de  $p \leq 0,05$ .

O padrão-ouro para detecção de tuberculose foi a cultura. Portanto, os casos de tuberculose foram definidos como cultura sólida ou cultura líquida positiva.

A sensibilidade (*sensibilidade clínica* =  $\frac{VP}{VP+FN}$ , sendo VP: verdadeiro positivo e FN; falso negativo) e a especificidade

(*especificidade clínica* =  $\frac{VN}{VN+FP}$ , sendo VN: verdadeiro negativo e FP: falso positivo) foram calculadas com auxílio do software Excel e o intervalo de confiança (95%) foi calculado pela metodologia de Clopper-Pearson, utilizando-se o software estatístico MedCalc ([https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)). Os pacientes com TB prévia foram analisados separadamente.

#### **4.2.7 Obtenção do DNA genômico a partir dos restos de reação do teste Xpert® MTB/RIF**

Após o término do teste Xpert® MTB/RIF, o cartucho foi mantido em geladeira por no máximo 72 horas até o procedimento de obtenção de DNA genômico a partir dos restos de reação. A superfície do cartucho foi limpa com hipoclorito de sódio 2% e álcool 70% e, com auxílio de uma agulha descartável, furou-se a janela de leitura do cartucho, por onde os restos de reação (aproximadamente 22 µL) foram removidos com auxílio de uma pipeta e ponteiros de 100 µL (VENTER et al., 2017). Os restos de reação foram mantidos a -20°C até o momento das análises.

Foram incluídas nos testes de genotipagem todas as amostras positivas de participantes que concordaram em participar do CE-II. Além disso, três pacientes que fizeram o controle de tratamento também foram convidados e consentiram a inclusão na etapa de genotipagem.

#### **4.2.8 Extração de DNA de isolados clínicos**

Após crescimento da bactéria na cultura a partir da amostra clínica, os isolados foram submetidos à extração de DNA pelo método do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), conforme protocolo de Van Soolingen e colaboradores (1994). O DNA extraído foi utilizado para as metodologias de *spoligotyping* e MIRU-15. Primeiramente, foi realizada a inativação da bactéria por meio do aquecimento de uma suspensão das colônias em 400 µL de TE 1X (solução tampão 10mM Tris/1mM EDTA, pH 8,0) (Promega – EUA/Bio-Rad – EUA) por 30 minutos a 90°C. Após resfriamento a temperatura ambiente, foram adicionados 50 µL de lisozima 10 mg/mL (Sigma-Aldrich - EUA), a mistura foi homogeneizada em um agitador do tipo vórtex e incubada por cerca de 24 horas a 37°C para a digestão da parede celular. A suspensão resultante foi misturada com uma solução de SDS/proteinase K (70 µL de SDS 10% e 5 µL de proteinase K 1%) (Invitrogen – EUA/Ambion -

EUA), homogeneizado no agitador do tipo vórtex e incubada a 65°C por 10 minutos para a lise das membranas e digestão proteica. Foram adicionados 100 µL de NaCl 5 mol/L (Merck - Alemanha) e 100 µL de CTAB/NaCl (brometo de cetil-trimetilamônio 10% em NaCl 5 mol/L) (Sigma-Aldrich - EUA). A suspensão foi agitada em vórtex e novamente incubada em um bloco térmico a 65°C por 10 minutos. Para a separação do DNA, foram adicionados 750 µL de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 ao tubo (Sigma-Aldrich – EUA/Vetec – Brasil), que foi agitado em vórtex e centrifugado por 5 minutos a 20.800 g. O sobrenadante aquoso foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 450 µL de isopropanol (Amresco – EUA) e incubado por 24 horas à -20°C para a precipitação do DNA. O tubo foi centrifugado por 15 minutos a 20.800 g e foi desprezado o sobrenadante vertendo o tubo. O sedimento foi lavado adicionando 1 mL de etanol 70% (SigmaAldrich – EUA) a frio, centrifugando por 5 minutos o tubo a 20.800 g e desprezando novamente o sobrenadante. O tubo foi colocado em um banho-maria seco à 37°C por aproximadamente 1 hora até secar o sedimento completamente. O DNA foi ressuscitado com 20 µL de tampão TE 1X e armazenado a -20°C.

#### **4.2.9 MIRU-15 a partir dos restos do teste Xpert® MTB/RIF e dos DNAs de isolados clínicos extraídos pelo CTAB**

As reações de PCR para os *loci* Mtub04, ETRC, MIRU04, MIRU40, MIRU10, MIRU16, Mtub21, Qub11b, ETRA, Mtub30, MIRU26, MIRU31, Mtub39, Qub26, Qub4156 foram realizadas seguindo as orientações de Supply e cols. (2000).

O protocolo utilizado para a amplificação das regiões próximas a cada um dos MIRU continha 5 µL de tampão 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega, EUA), 1 µL de cada amostra (resto de reação do teste Xpert® MTB/RIF diluído 1/10 ou puro ou DNA de isolados clínicos diluídos 1/100), 2,0 µL de cloreto de magnésio (concentração final de 2,0 mM), 0,5 µL de cada um dos iniciadores da Tabela 14 (5 pmoles por reação), 0,5 µL de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTPs; concentração de 0,5 mM de cada), 0,25 µL de DMSO (concentração final de 1%) e 0,1 µL de Taq DNA polimerase (0,5 U por reação; GoTaq® Hot Start Polymerase, Promega, EUA) em um volume total de 25 µL. As condições da PCR foram 95°C/15 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C/1 minuto, 55°C/1 minuto e 72°C por 2 minutos e, para a extensão final, 72°C/10 minutos.

As PCRs foram feitas utilizando o DNA genômico obtido a partir dos restos do teste Xpert® MTB/RIF na diluição 1/10 e puro. Para confirmação, foi feito o MIRU-15 também com o DNA extraído do isolado clínico após cultura.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,3% a 100 V por 60-120 minutos, dependendo do *locus*, e corados pelo brometo de etídio (concentração final no gel de 1µg/mL). Juntamente com as amostras foi aplicado no gel um padrão de tamanho molecular 100 pb *ladder* (Ludwig - Brasil). Os géis foram visualizados e fotografados sobre uma fonte de iluminação UV de 320 nm. Após a separação, os tamanhos dos produtos foram estimados de acordo com os padrões de tamanho molecular utilizados. Para expressão dos resultados foram utilizados os números de alelos correspondentes aos produtos amplificados obtidos, formando 15 números em sequência, que representam cada *locus* (Tabela 15). São possíveis até 15 alelos para cada locus, mas como nenhum isolado teve mais do que 10 alelos optou-se por excluir da tabela o tamanho dos produtos com 11 ou mais alelos.

Tabela 14 - Relação dos iniciadores forward e reverse que foram utilizados na reação de PCR do MIRU-15

Locus	Sequência dos iniciadores
Mtub04	5'-CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT-3' 5'-GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC-3'
ETRC	5'-CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT-3' 5'-AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA-3'
MIRU04	5'-GCGCGAGAGCCCCGAAC TGC-3' 5'-GCGCAGCAGAAACGCCAGC-3'
MIRU40	5'-GGGTTGCTGGATGACAACGTGT-3' 5'-TATCTGATTTCCGCCGAGATCACCC-3'
MIRU10	5'-GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC-3' 5'-AGGTAGCTGATCACCAAGGTGGC-3'
MIRU16	5'-TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA-3' 5'-GTACCAGGGCTGCACGACGGG-3'
Mtub21	5'-AGATCCCAGTTGTCGTCGTC-3' 5'-CAACATCGCCTGGTTCTGTA-3'
Qub11b	5'-CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG-3' 5'-CGAAGTGAATGGTGGCAT-3'
ETRA	5'-AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT-3' 5'-CGAAGCCTGGGGTGCCCGCATTT-3'
Mtub30	5'-CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT-3' 5'-ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA-3'
MIRU26	5'-TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC-3' 5'-CTATTGCCTGGTCGCCTATG-3'
MIRU31	5'-ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA-3' 5'-ATCAAGACCACGTCCGGCAC-3'
Mtub39	5'-CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC-3' 5'-TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG-3'
Qub26	5'-AACGCTCAGCTGTCCGAT-3' 5'-CGGCCGTGCCGGCCAGTCCCTCCCGAT-3'
Qub4156	5'-TGACCACGGATTGCTCTAGT-3' 5'-GCCGGCGTCCATGTT-3'

Fonte: adaptado de Supply e cols. (2000).

A diversidade alélica do MIRU foi estimada pelo Índice Discriminatório de Hunter-Gaston (HGDI –*Hunter-Gaston Discriminatory Index*) (HUNTER, GASTON; 1988) com auxílio do site [http://insilico.ehu.es/mini\\_tools/discriminatory\\_power/index.php](http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/index.php).

Tabela 15 - Relação entre o tamanho do produto amplificado e o número de repetições de cada locus

Locus	Tamanho da repetição (pb)	Tamanho do produto amplificado (pb) em função do número de repetições (alelos 1 a 10)										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mtub4	51	537	588	639	690	741	792	843	894	945	996	1047
ETR C	58	171	208	266	324	382	440	498	556	614	672	730
MIRU 04	77	122	199	276	353	430	507	584	661	738	815	892
	77 <sup>#</sup>	175	252	329	406	483	560	637	714	791	868	945
MIRU 40	54	354	408	462	516	570	624	678	732	786	840	894
MIRU 10	53	484	537	590	643	696	749	802	855	908	961	1014
MIRU 16	53	565	618	671	724	777	830	883	936	989	1042	1095
Mtub21	57	92	149	206	263	320	377	434	491	548	605	662
Qub11b	69	77	146	215	284	353	422	491	560	629	698	767
ETR A	75	195	270	345	420	495	570	645	720	795	870	945
Mtub30	58	247	305	363	421	479	537	595	653	711	769	827
MIRU 26	51	285	336	387	438	489	540	591	642	693	744	795
MIRU 31	53	492	545	598	651	704	757	810	863	916	969	1022
Mtub39	58	272	330	388	446	504	562	620	678	736	794	852
Qub26	111	187	298	409	520	631	742	853	964	1075	1186	1297
Qub4156	59	563	622	681	740	799	858	917	976	1035	1094	1153

#: O locus 04 pode apresentar variação do tamanho do produto em algumas cepas (1', 2', 3', etc.).

Fonte: adaptado de Supply e cols. (2000).

#### 4.2.10 Spoligotyping a partir dos restos do teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF e dos DNAs de isolados clínicos extraídos pelo CTAB

Na primeira etapa do *spoligotyping* faz-se uma PCR para amplificar os espaçadores do locus DR. Os iniciadores utilizados, *forward* e *reverse* pareiam nos finais e nos incios de cada região repetitiva DR, respectivamente. As reações, com volume final de 50 µL, foram compostas por 10 µL de tampão 5X GoTaq<sup>®</sup> Flexi Buffer



(Promega – EUA), 1 µL de DNA de cada amostra, 3,0 µL de cloreto de magnésio (concentração final de 1,5 mM), 1 µL de cada um dos iniciadores DRa (5'-Biot-GGTTTTGGGTCTGACGAC-3'; 10 pmoles por reação) e DRb (5'-CCGAGAGGGGACGAAAC-3'; 10 pmoles por reação), 0,4 µL de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTPs; concentração de 0,2 mM de cada) e 0,5 µL de Taq DNA polimerase (2,5 U por reação; GoTaq® Polymerase, Promega, EUA) em um volume total de 50 µL. As condições da PCR foram 94°C por 3 minutos, seguido por 20 ciclos de 96°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos e, para a extensão final 72°C por 5 minutos.

Para a hibridização na membrana, 45 µL do produto amplificado foram diluídos 150 µL de SSPE 2X (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,02 M, NaCl 0,36 M, EDTA 2 mM – pH 7,4) /SDS 0,1% (Merck – Alemanha/Bio-rad – EUA/Invitrogen – EUA), aquecidos a 99°C por 10 minutos para abertura da dupla-fita de DNA e colocados em gelo imediatamente após terminar a incubação para conservação da separação em fitas simples. As amostras diluídas foram cuidadosamente pipetadas (sem deixar bolhas de ar) na membrana comercial com os 43 oligonucleotídeos imobilizados para hibridização de 43 possíveis espaçadores com a ajuda de um *miniblotter* (Ocimum Biosolutions - Índia). O conjunto foi colocado em uma estufa (Marconi - Brasil) a 60°C por 60 minutos para hibridização. Foram realizadas duas lavagens da membrana com SSPE 2X/SDS 0,5% a 60°C por 10 minutos. A membrana foi inserida em uma garrafa circular de 40 mm de diâmetro e misturada com 1,25 U do conjugado estreptavidina-peroxidase (Roche – Suíça) em SSPE 2X/SDS 0,5%. A garrafa foi incubada a 35°C por 50 minutos e, em seguida, foram realizadas duas lavagens a 35°C por 10 minutos e duas lavagens a temperatura ambiente por 5 minutos. Para a detecção da presença do produto amplificado na membrana foi utilizado o kit ECL™ (Amersham Biosciences - Inglaterra), por meio da técnica de quimioluminescência. A membrana foi transferida da garrafa para o interior de um saco plástico com alta transparência, foram adicionados cerca de 20 mL do reagente ECL™. O saco plástico foi colocado no chassi/ecran radiográfico (Konex – Brasil) e coberto com um filme radiográfico (Agfa Healthcare - Brasil). Após 10 a 20 minutos de incubação foram realizadas as etapas finais de revelação, fixação, lavagem e secagem do filme. A leitura do *spoligotyping* foi feita por meio do padrão de presença/ausência dos 43 espaçadores. A presença do espaçador é representada pelo quadrado preto e a ausência do espaçador pelo quadrado branco.

Após a determinação do perfil, a amostra foi comparada com o banco mundial de *spoligotypes* The SITVIT Database (<http://www.pasteurguadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/trouverSouchesParSpoligo.jsp>; Institute Pasteur de Guadalupe, França). Quando duas ou mais cepas depositadas no banco possuem o mesmo perfil é criado um SIT (*Shared International Type*). As cepas que possuem perfil único são denominadas órfãs e as cepas que não possuem nenhum correspondente ainda no banco são denominadas *unknown* (KAMERBEEK et al., 1997; SOLA et al., 2001).

#### **4.2.11 Análise conjunta de spoligotyping e MIRU**

Para a análise conjunta das duas técnicas de epidemiologia molecular de *M. tuberculosis* foi utilizada a ferramenta MIRU-VNTR*plus*, disponível no site <https://www.miru-vntrplus.org>. Para obtenção da distância entre as amostras, o dendrograma filogenético foi feito utilizando o algoritmo UPGMA.

*Cluster* foi definido como um grupo de amostras que apresentam 100% de similaridade genética nos métodos de genotipagem (GONZÁLEZ DÍAZ et al., 2015; WANG et al., 2014; YANG et al., 2015).

#### **4.2.12 Aspectos éticos**

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC), com o CAAE nº 64415617.7.0000.0121.

### **4.3 RESULTADOS**

#### **4.3.1 Padronização e avaliação preliminar da descontaminação pelo método NALC/NaOH para a cultura líquida manual**

Entre as 20 amostras submetidas ao método, 15 amostras foram negativas na cultura pelos métodos direto (O-K) e após descontaminação (NALC/NaOH - L-J). As demais quatro amostras clínicas e a amostra contaminada com H37Rv foram positivas e constam na Tabela 16. Entre as cinco amostras, três foram positivas nas duas metodologias e duas foram negativas no O-K, mas positivas no L-J após descontaminação pelo método do NALC-NaOH. Essa análise preliminar

demonstrou que o método tem potencial para aumentar a sensibilidade analítica em relação ao método utilizado na rotina.

Tabela 16 - Comparação da descontaminação pelo método de Ogawa-Kudoh (O-K) e pelo método do NALC-NaOH e meio sólido Lowenstein-Jensen (L-J) com resultado positivo.

Amostra	Resultado da cultura	
	O-K	NALC/NaOH - L-J
Amostra negativa com H37Rv	+++	+++
Amostra 1	+	+
Amostra 9	++	++
Amostra 12	Ausência	2 UFC
Amostra 16	Ausência	1 UFC

Legenda: UFC: unidades formadoras de colônias.

Fonte: o autor.

#### 4.3.2 Comparação entre cultura líquida manual com descontaminação pelo método do NALC-NaOH e cultura sólida

A comparação dos resultados da cultura líquida manual (Middlebrook 7H9-OADC-PANTA) com descontaminação pelo método do NALC-NaOH e da cultura em meio sólido (Ogawa-Kudoh ou Lowenstein-Jensen) foi realizada com 182 amostras pulmonares e 90 amostras extrapulmonares.

Entre as amostras pulmonares, oito amostras na cultura líquida e cinco amostras na cultura sólida apresentaram contaminação. Dezessete amostras foram positivas nos dois métodos, uma foi positiva somente na cultura líquida (negativa na baciloscopia) e duas foram positivas somente na cultura sólida (ambas positivas com duas cruzes na baciloscopia).

Nas amostras extrapulmonares, três amostras de líquido pleural foram positivas nas duas culturas, uma amostra de aspirado de medula óssea (positiva com três cruzes na baciloscopia) foi positiva apenas na cultura sólida e nenhuma amostra foi positiva apenas na cultura líquida. Apenas uma amostra apresentou contaminação na cultura líquida, o que não ocorreu na cultura em meio sólido das amostras extrapulmonares (Tabela 17).

Portanto, na cultura sólida cresceram 18/19 amostras pulmonares e 4/4 amostras extrapulmonares e na cultura líquida houve crescimento de 17/19 amostras pulmonares e 3/4 amostras extrapulmonares

Em três amostras houve crescimento de MNT. Em uma amostra de escarro (com 1 BAAR em 100 campos analisados na baciloscopia) e uma de aspirado brônquico (com ausência de BAAR na baciloscopia) coletados do mesmo participante houve o crescimento de *M. bohemicum* e em uma amostra de aspirado brônquico de outro participante houve crescimento de *M. abscessus* (três cruzeiros na baciloscopia). Essas três amostras apresentaram crescimento das micobactérias tanto no meio sólido como no meio líquido (resultados não tabelados).

Tabela 17 - Resultados da comparação entre cultura líquida manual utilizando o meio Middlebrook 7H9-OADC-PANTA e cultura sólida utilizando os meios Ogawa-Kudoh ou Lowenstein-Jensen em amostras recebidas entre maio de 2017 e maio de 2018

Cultura sólida	Cultura líquida manual					
	Nº de amostras pulmonares			Nº de amostras extrapulmonares		
	Positivo	Negativo	Cont.	Positivo	Negativo	Cont.
Positivo						
1-20 UFC	4	0	0	3	0	0
+	3	0	0	0	0	0
++	3	1	0	0	0	0
+++	7	1	0	0	1	0
Negativo	1 <sup>a</sup>	149	8	0	81	1
Cont.	0	5	0	0	0	0

Legenda: UFC: unidades formadoras de colônia; Cont.: contaminação.  
a) o resultado da baciloscopia da amostra foi ausência.

Fonte: o autor.

### 4.3.3 Caracterização dos participantes

Foram incluídos 238 participantes com amostras pulmonares e/ou extrapulmonares, sendo que de 140 participantes foram somente amostras pulmonares, de 77 somente amostras extrapulmonares e de 11 participantes foram amostras pulmonares e extrapulmonares.

As características dos pacientes nos grupos de amostras pulmonares e extrapulmonares estão na Tabela 18.

Os participantes mais frequentes foram os idosos, especialmente nas amostras pulmonares pois cerca de 2/3 dos participantes tinham 50 anos de idade ou mais. Porém, esse fato não foi observado nos

participantes com TB, uma vez que a doença foi diagnosticada em participantes de todas os grupos de idades de forma parecida.

Em relação aos sintomas relatados pelos participantes, a tosse por mais de duas semanas (94,7% vs 65,6%), a sudorese noturna (68,4 vs 43,7) e a perda de peso (84,2 vs 62,9) estavam em percentuais significativamente maiores em participantes com TB pulmonar do que nos participantes das amostras pulmonares em geral. Outra diferença significativa entre os percentuais pode ser observada no contato com parentes ou amigos que tiveram TB pulmonar, que foi de 36,8% nos participantes com TB e 16,6% nos global das amostras pulmonares. As características que apresentaram diferença estatisticamente significativa estão na tabela 19.

Os participantes do sexo masculino estiveram presentes em maior número em todas as amostras. A razão entre número de casos de TB positiva em participantes do sexo masculino em relação ao número de casos em participantes do sexo feminino foi de 1,38 nas amostras pulmonares e 3,00 nas amostras extrapulmonares.

Tabela 18 - Características clínico-epidemiológicas dos pacientes incluídos no CP-II.

Característica	Grupo	P-P		P-EP	
		Todos (%)	TB+ (%)	Todos (%)	TB+ (%)
Idade	<20,0	3 (2,0)	3 (15,8)	9 (10,2)	1 (25,0)
	20,0-29,9	12 (7,9)	3 (15,8)	13 (14,8)	1 (25,0)
	30,0-39,9	18 (11,9)	3 (15,8)	15 (17,0)	1 (25,0)
	40,0-49,9	16 (10,6)	2 (10,5)	20 (22,7)	—
	50-59,9	34 (22,5)	4 (21,1)	11 (12,5)	—
	≥60,0	68 (45,0)	4 (21,1)	20 (22,7)	1 (25,0)
Sexo	Feminino	71 (47,0)	8 (42,1)	40 (45,5)	1 (25,0)
	Masculino	80 (53,0)	11 (57,9)	48 (54,5)	3 (75,0)
Grau de escolaridade	Não estudou	11 (7,3)	—	3 (3,4)	1 (25,0)
	Fundamental incompleto	49 (32,5)	7 (36,8)	20 (22,7)	1 (25,0)
	Fundamental completo	34 (22,5)	3 (15,8)	13 (14,8)	—
	Médio incompleto	9 (6,0)	—	7 (8,0)	—
	Médio completo	23 (15,2)	4 (21,1)	26 (29,5)	1 (25,0)
	Superior incompleto	7 (4,6)	2 (10,5)	7 (8,0)	—
	Superior completo	15 (9,9)	2 (10,5)	12 (13,6)	1 (25,0)
	Não quis responder	3 (2,0)	1 (5,3)	—	—
Tuberculose prévia	Sim	28 (18,5)	5 (26,3)	2 (2,3)	1 (25,0)
	Não	123 (81,5)	14 (73,7)	86 (97,7)	3 (75,0)
Fumante ou ex-fumante	Sim	50 (33,1)	5 (26,3)	11 (12,5)	—
	Não	48 (31,8)	6 (31,6)	40 (45,5)	3 (75,0)
	Não disponível	53 (35,1)	8 (42,1)	37 (42,0)	1 (25,0)
Usuário ou ex-usuário de DI	Sim	13 (8,6)	2 (10,5)	6 (6,8)	1 (25,0)
	Não	137 (90,7)	16 (84,2)	81 (92,0)	3 (75,0)
	Não quis responder	1 (0,7)	1 (5,3)	1 (1,1)	—
Vacina BCG	Sim	114 (75,5)	13 (68,4)	74 (84,1)	2 (50,0)
	Não	18 (11,9)	3 (15,8)	8 (9,1)	1 (25,0)
	Não soube responder	19 (12,6)	3 (15,8)	6 (6,8)	1 (25,0)
HIV	Positivo	18 (11,9)	2 (10,5)	10 (11,4)	1 (25,0)
	Negativo	93 (61,6)	14 (73,7)	65 (73,9)	1 (25,0)
	Não quis/soube responder	40 (26,5)	3 (15,8)	13 (14,8)	2 (50,0)
Tosse > 2 sem.	Sim	99 (65,6)	18 (94,7)	24 (27,3)	2 (50,0)
	Não	52 (34,4)	1 (5,3)	64 (72,7)	2 (50,0)

(continuação)

Característica	Grupo	P-P		P-EP	
		Todos (%)	TB+ (%)	Todos (%)	TB+ (%)
Contato com pessoa com tuberculose	Sim	25 (16,6)	7 (36,8)	5 (5,7)	—
	Não	106 (70,2)	9 (47,4)	74 (84,1)	3 (75,0)
	Não soube responder	20 (13,2)	3 (15,8)	9 (10,2)	1 (25,0)
Sudorese noturna	Sim	66 (43,7)	13 (68,4)	22 (25,0)	2 (50,0)
	Não	80 (53,0)	5 (26,3)	64 (72,7)	2 (50,0)
	Não soube responder	5 (3,3)	1 (5,3)	2 (2,3)	—
Perda de peso	Sim	95 (62,9)	16 (84,2)	53 (60,2)	2 (50,0)
	Não	53 (35,1)	2 (10,5)	33 (37,5)	2 (50,0)
	Não soube responder	3 (2,0)	1 (5,3)	2 (2,3)	—
Total		151 (100,0)	19 (100,0)	88 (100,0)	4 (100,0)

Legenda: P-P: participante das amostras pulmonares; P-EP: participante das amostras extrapulmonares; DI: drogas ilícitas.

Fonte: o autor.

Tabela 19 - Características dos pacientes incluídos no CE-II com diferenças estatisticamente significativas.

Característica	Resposta	Resultado da cultura		Valor de p
		Positivo	Negativo	
Tosse por mais de duas semanas	Sim	18	81	0,004
	Não	1	51	
Contato com pessoa com TB	Sim	7	18	<0,001
	Não	9	97	
Sudorese noturna	Sim	13	53	0,01
	Não	5	75	
Perda de peso	Sim	16	79	0,02
	Não	2	51	

Legenda: TB: tuberculose.

Fonte: o autor.

#### 4.3.4 Avaliação dos testes em amostras pulmonares

Amostras do mesmo tipo (como por exemplo dois ou mais escarros) e do mesmo paciente que foram recebidas em um intervalo menor de 15 dias foram agrupadas em uma só amostra, o que resultou em 178 amostras pulmonares dos 151 participantes, sendo 144 amostras

de pacientes sem histórico de TB e 34 amostras de pacientes com TB previa.

A amostra mais frequente foi o escarro (55,1%), seguido por lavado broncoalveolar (LBA; 21,9%) e aspirado brônquico (AB; 16,9%). As demais amostras representaram 6,3% do total de amostras pulmonares recebidas, conforme pode ser visualizado na Tabela 20.

Tabela 20 - Amostras pulmonares com resultados válidos na cultura (positivo ou negativo) e incluídas no CP-II.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Número de amostras (%)</b>
Escarro	98 (55,1)
Lavado broncoalveolar	39 (21,9)
Aspirado brônquico	30 (16,9)
Lavado brônquico	9 (5,1)
Secreção traqueal	1 (0,6)
Biopsia de nódulo de pulmão	1 (0,6)
<b>Total</b>	<b>178 (100,0)</b>

Fonte: o autor.

A cultura foi positiva em amostras pulmonares obtidas de 19 (12,6%) pacientes, sendo 14 pacientes sem histórico de TB e 5 pacientes com histórico de TB previa.

Entre todas as amostras pulmonares positivas, apenas uma delas era de um participante vivendo com o HIV, que foi detectada tanto pela baciloscopia como pela cultura.

A sensibilidade e a especificidade da baciloscopia em amostras pulmonares de pacientes sem histórico de TB foram de 80,0% (IC95 51,9-95,7%) e 98,5% (IC95 94,5-99,8%), respectivamente. Como grande parte das amostras recebidas eram escarro, LBA ou AB, foram avaliadas a sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos nas amostras obtidas espontaneamente ou por broncoscopia. Nos pacientes sem histórico de TB, a baciloscopia apresentou sensibilidade de 75,0% (IC95 34,9-96,8%) em amostras espontâneas e 85,7% (IC95 42,1-99,6%) em amostras coletadas por broncoscopia (Tabela 21). Em duas amostras na baciloscopia foram obtidos resultados falso-positivos, sendo que em uma delas foi encontrado apenas um BAAR em 100 campos observados e a bactéria que cresceu na cultura foi *M. bohemicum* e na outra amostra a baciloscopia foi positiva duas cruzes, porém não houve crescimento de micobactérias na cultura.



Tabela 21 - Comparação da sensibilidade e especificidades clínicas da baciloscopia em amostras pulmonares obtidas de participantes sem histórico de tuberculose incluídos no CP-II

<b>Amostra</b>	<b>VP</b>	<b>FP</b>	<b>FN</b>	<b>VN</b>	<b>Sensibilidade (95% IC)</b>	<b>Especificidade (95% IC)</b>
Escarro	6	1	2	66	75,0 (34,9-96,8)	98,5 (92,0-100,0)
ST	0	0	0	1	*	100,0 (2,5-100,0)
AB	4	1	1	20	80,0 (28,4-99,5)	95,24 (76,2-99,9)
LB	1	0	0	7	100,0 (2,5-100,0)	100,0 (59,0-100,0)
LBA	1	0	0	32	100 (2,5-100,0)	100,0 (89,1-100,0)
BNP	0	0	0	1	*	100,0 (2,5-100,0)
Escarro + ST	6	1	2	67	75,0 (34,9-96,8)	98,5 (92,1-100,0)
AB + LB + LBA	6	1	1	59	85,7 (42,1-99,6)	98,3 (91,1-100,0)
Total	12	2	3	127	80,0 (51,9-95,7)	98,5 (94,5-99,8)

Legenda: AB: aspirado brônquico; LB: lavado brônquico; LBA: lavado bronco-alveolar; ST: secreção traqueal; BNP: biópsia de nódulo pulmonar; VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VN: verdadeiro-negativo.

Fonte: o autor.

No teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF em amostras pulmonares de pacientes sem histórico de TB, a sensibilidade foi de 100,0% nos dois grupos de amostras. A especificidade foi de 96,9% (IC95 92,3-99,2%) na avaliação de todas as amostras, 100,0% (IC95 94,7-100,0%) nas amostras espontâneas e 93,3% (IC95 83,8-98,2%) nas amostras de LBA, LB e AB (Tabela 22).

Ainda em relação à performance do teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF, tanto em amostras pulmonares com baciloscopia positiva (12 amostras) como em amostras pulmonares com baciloscopia negativa (2 amostras) a sensibilidade foi de 100,0%.

Tabela 22 - Comparação da sensibilidade e especificidades clínicas do teste Xpert® MTB/RIF em amostras pulmonares obtidas de participantes sem histórico de tuberculose incluídos no CP-II

Amostra	VP	FP	FN	VN	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)
Escarro	8	0	0	67	100,0 (63,1-100,0)	100,0 (94,6-100,0)
ST	0	0	0	1	*	100,0 (2,5-100,0)
AB	5	2	0	19	100 (47,8-100,0)	90,5 (69,6-98,8)
LB	1	0	0	7	100,0 (2,5-100,0)	100,0 (59,0-100,0)
LBA	1	2	0	30	100,0 (2,5-100,0)	93,8 (79,2-99,2)
BNP	0	0	0	1	*	100,0 (2,5-100,0)
Escarro + ST	8	0	0	68	100,0 (63,1-100,0)	100,0 (94,7-100,0)
AB + LB + LBA	7	4	0	56	100,0 (59,0-100,0)	93,3 (83,8-98,2)
Total	15	4	0	125	100,0 (78,2-100,0)	96,9 (92,3-99,2)

Legenda: AB: aspirado brônquico; LB: lavado brônquico; LBA: lavado bronco-alveolar; ST: secreção traqueal; BNP: biópsia de nódulo pulmonar; VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VN: verdadeiro-negativo.

Fonte: o autor.

Nos pacientes com histórico de TB prévia a baciloscopia apresentou sensibilidade e especificidade clínicas de 100,0% (IC95 47,8-100,0%) e 93,1% (IC95 77,2-99,2%), respectivamente (tabela 23). A especificidade foi de 93,1% porque duas amostras foram positivas na baciloscopia e negativas na cultura para *M. tuberculosis*. Em uma delas foi encontrado apenas um BAAR em 100 campos analisados e na outra amostra cresceu uma MNT (*M. abscessus*), apesar do paciente de ter histórico de infecção por *M. tuberculosis* e por *M. abscessus*. Nenhuma amostra de LBA, LB ou AB coletada de pacientes com histórico de TB foi positiva na cultura e, por isso, não foi possível calcular a sensibilidade nessas amostras.

Tabela 23 - Comparação da sensibilidade e especificidade clínicas da baciloscopia em amostras obtidas espontaneamente ou por broncoscopia de participantes com tuberculose prévia incluídos no CP-II

<b>Amostra</b>	<b>VP</b>	<b>FP</b>	<b>FN</b>	<b>VN</b>	<b>Sensibilidade (95% IC)</b>	<b>Especificidade (95% IC)</b>
Escarro	5	0	0	18	100,0 (47,8-100,0)	100,0 (81,5-100,0)
AB	0	1	0	3	*	75,0 (19,4-99,4)
LB	0	0	0	1	*	100,0 (2,5-100,0)
LBA	0	1	0	5	*	83,3 (35,9-99,6)
AB + LB + LBA	0	2	0	9	*	81,8 (48,2-97,7)
Total	5	2	0	27	100,0 (47,8-100,0)	93,1 (77,2-99,2)

Legenda: AB: aspirado brônquico; LB: lavado brônquico; LBA: lavado bronco-alveolar; ST: secreção traqueal; VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VN: verdadeiro-negativo.

Fonte: o autor.

O teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF apresentou sensibilidade de 100,0% (IC95 47,8-100,0%) para detecção de casos positivos na cultura em pacientes com TB prévia, porém a especificidade foi menor do que a da baciloscopia (82,8%; IC95 64,2-94,2%) conforme pode ser observado na Tabela 24.

Tabela 24 - Comparação da sensibilidade e especificidades clínicas do teste Xpert® MTB/RIF em amostras obtidas espontaneamente ou por broncoscopia de participantes com tuberculose prévia incluídos no CP-II

Amostra	VP	FP	FN	VN	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)
Escarro	5	4	0	14	100,0 (47,8-100,0)	77,8 (52,4-93,6)
AB	0	0	0	4	*	100,0 (39,8-100,0)
LB	0	0	0	1	*	100,0 (2,5-100,0)
LBA	0	1	0	5	*	83,3 (35,9-99,6)
AB + LB + LBA	0	1	0	10	*	90,9 (58,7-99,8)
Total	5	5	0	24	100,0 (47,8-100,0)	82,8 (64,2-94,2)

Legenda: AB: aspirado brônquico; LB: lavado brônquico; LBA: lavado bronco-alveolar; ST: secreção traqueal; VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VN: verdadeiro-negativo.

Fonte: o autor.

Na estratificação da sensibilidade dos testes diagnósticos pelo resultado da cultura, a baciloscopia apresentou sensibilidade de 50,0% (IC95 6,8-93,2%) em amostras com 1-20 UFC e 100,0% nas amostras com uma ou mais cruzes na cultura (Tabela 25)

Tabela 25 - Sensibilidade clínica do Xpert® MTB/RIF e da baciloscopia de acordo com o número de cruzes da cultura das amostras pulmonares incluídas no CP-II

Cultura	Baciloscopia			Xpert® MTB/RIF		
	VP	FN	Sensibilidade (95% IC)	VP	FN	Sensibilidade (95% IC)
1-20 UFC	2	2	50,0 (6,8-93,2)	4	0	100,0 (39,8-100,0)
+	3	0	100,0 (29,2-100,0)	3	0	100,0 (29,2-100,0)
++	4	0	100,0 (39,8-100,0)	4	0	100,0 (39,8-100,0)
+++	8	0	100,0 (63,1-100,0)	8	0	100,0 (63,1-100,0)
— <sup>a</sup>	0	1	0,0 (0,0-97,5)	1	0	100,0 (2,5-100,0)

Legenda: a) uma amostra foi negativa na cultura sólida e positiva na cultura líquida, que não possui semiquantificação; VP: verdadeiro-positivo; FN: falso-negativo.

Fonte: o autor.

### 4.3.5 Avaliação dos testes em amostras extrapulmonares

Foram incluídas 98 amostras extrapulmonares com resultados válidos de cultura, baciloscopia e teste Xpert® MTB/RIF de 88 participantes. Dez participantes tiveram duas amostras coletadas e enviadas em um intervalo menor do que 15 dias e, por esse motivo, elas foram agrupadas para a análise de dados.

O líquido cefalorraquidiano (LCR) foi a amostra extrapulmonar recebida em maior número (60,2%), seguido por líquido pleural (LQP; 26,1%), líquido ascítico (LQA; 6,8%) e aspirado ou biópsia de linfonodo (4,5%). As outras duas amostras recebidas foram de aspirado de medula óssea (AMO) e urina (Tabela 26).

Tabela 26 - Amostras extrapulmonares com resultados válidos na cultura (positivo ou negativo) e incluídas no CP-II.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Número de amostras (%)</b>
Líquido cefalorraquidiano	53 (60,2)
Líquido pleural	23 (26,1)
Líquido ascítico	6 (6,8)
Material de linfonodo	4 (4,5)
Aspirado de medula óssea	1 (1,1)
Urina	1 (1,1)
<b>Total</b>	<b>88 (100,0)</b>

Fonte: o autor.

Quatro amostras apresentaram crescimento de *M. tuberculosis* na cultura, sendo três de LQP e uma de aspirado de medula óssea. Entre as quatro amostras, um LQP era de um participante vivendo com o HIV, que foi detectado pelo teste Xpert® MTB/RIF, mas não foi detectado pela baciloscopia.

A baciloscopia detectou apenas uma das quatro amostras extrapulmonares positivas na cultura. Essa amostra é um aspirado de medula óssea e apresentou alta carga bacilar (três cruces na baciloscopia). Assim, a baciloscopia apresentou sensibilidade de 25,0% (IC95 0,6-80,6%) e especificidade de 100,0% (IC95 95,7-100,0%) nas amostras extrapulmonares (Tabela 27).

Tabela 27 - Sensibilidade e especificidade clínicas da baciloscopia em amostras extrapulmonares incluídas no CP-II

Amostra	VP	FP	FN	VN	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)
LCR	0	0	0	53	*	100,0 (93,3-100,0)
LQP	0	0	3	20	0,0 (0,0-70,8)	100,0 (29,2-100,0)
LQA	0	0	0	6	*	100,0 (54,1-100,0)
AMO	1	0	0	0	100,0 (2,5-100,0)	*
ML	0	0	0	4	*	100,0 (39,8-100,0)
Urina	0	0	0	1	*	100,0 (2,5-100,0)
Total	1	0	3	84	25,0 (0,6-80,6)	100,0 (95,7-100,0)

Legenda: LCR: líquido cefalorraquidiano; LQP: líquido pleural; LQA: Líquido ascítico; AMO: aspirado de medula óssea; ML: material de linfonodo; VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VN: verdadeiro-negativo. \*: não foi possível calcular.

No teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF foram detectadas três amostras, sendo duas com resultado verdadeiro-positivo e uma com resultado falso-positivo. A sensibilidade e a especificidade do teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF em amostras extrapulmonares foram de 50,0% (IC95 6,8-93,2%) e 98,8% (IC95 93,5-100,0%), respectivamente (Tabela 30).

Tabela 28 - Sensibilidade e especificidade clínicas do teste Xpert® MTB/RIF em amostras extrapulmonares incluídas no CP-II

<b>Amostra</b>	<b>VP</b>	<b>FP</b>	<b>FN</b>	<b>VN</b>	<b>Sensibilidade (95% IC)</b>	<b>Especificidade (95% IC)</b>
LCR	0	1	0	52	*	98,1 (89,9-100,0)
LQP	1	0	2	20	33,3 (0,8-90,6)	100,0 (83,1-100,0)
LQA	0	0	0	6	*	100,0 (54,1-100,0)
AMO	1	0	0	0	100,0 (2,5-100,0)	*
ML	0	0	0	4	*	100,0 (39,8-100,0)
Urina	0	0	0	1	*	100,0 (2,5-100,0)
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>83</b>	<b>50,0 (6,8-93,2)</b>	<b>98,8 (93,5-100,0)</b>

Legenda: LCR: líquido cefalorraquidiano; LQP: líquido pleural; LQA: Líquido ascítico; AMO: aspirado de medula óssea; ML: material de linfonodo; VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VN: verdadeiro-negativo. \*: não foi possível calcular.

Fonte: o autor

A análise da sensibilidade e especificidade em relação à carga bacilar (semiquantificação da cultura) demonstrou que na amostra com três cruces na cultura os dois testes diagnósticos foram positivos. Já em amostras paucibacilares, a baciloscopia não detectou nenhuma das três amostras e o teste Xpert® MTB/RIF detectou uma das três amostras, o que resultou em uma sensibilidade de 33,3% (IC95 0,8-90,6%) (Tabela 29).

Tabela 29 - Sensibilidade clínica da baciloscopia e do Xpert® MTB/RIF em amostras extrapulmonares incluídas no CP-II de acordo com o número de cruzes da cultura

Cultura	Baciloscopia			Xpert® MTB/RIF		
	VP	FN	Sensibilidade (95% IC)	VP	FN	Sensibilidade (95% IC)
1-20 UFC	0	3	0,0 (0,0-70,8)	1	2	33,3 (0,8-90,6)
+	-	-	-	-	-	-
++	-	-	-	-	-	-
+++	1	0	100,0 (2,5-100,0)	1	0	100,0 (2,5-100,0)

Legenda: VP: verdadeiro-positivo; FN: falso-negativo; UFC: unidade formadora de colônia.

Fonte: o autor.

#### 4.3.6 Avaliação do teste Xpert® MTB/RIF na detecção de resistência à rifampicina

Vinte e nove amostras apresentaram resultado detectado no teste Xpert® MTB/RIF, mas em cinco amostras de escarro e uma de ASPB o resultado do TSA não estava disponível por motivos de contaminação ou falta de reagentes.

Duas amostras foram positivas no Xpert® MTB/RIF, porém o antibiograma estava disponível apenas para uma (LQP).

Tanto a sensibilidade como a especificidade foram de 100,0%, conforme pode ser observado na Tabela 30.



Tabela 30 - Resultados de sensibilidade e especificidade clínicas do teste Xpert® MTB/RIF na detecção de resistência à rifampicina em relação ao TSA em amostras extrapulmonares incluídas no CP-II

Amostra	VP	FP	FN	VN	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)
Escarro	2	0	0	10	100,0 (15,8-100,0)	100,0 (69,2-100,0)
LB	0	0	0	1	*	100,0 (2,5-100,0)
AB	0	0	0	6	*	100,0 (54,1-100,0)
LBA	0	0	0	4	*	100,0 (39,8-100,0)
LQP	0	0	0	1	*	100,0 (2,5-100,0)
Total	2	0	0	22	100,0 (15,8-100,0)	100,0 (84,6-100,0)

Legenda: AB: aspirado brônquico; LBA: lavado bronco-alveolar; ST: secreção traqueal; LQP: líquido pleural; AMO: aspirado de medula óssea; VP: verdadeiro-positivo; FP: falso-positivo; FN: falso-negativo; VN: verdadeiro-negativo. \*: não foi possível calcular.

Fonte: o autor.

#### 4.3.7 MIRU-15

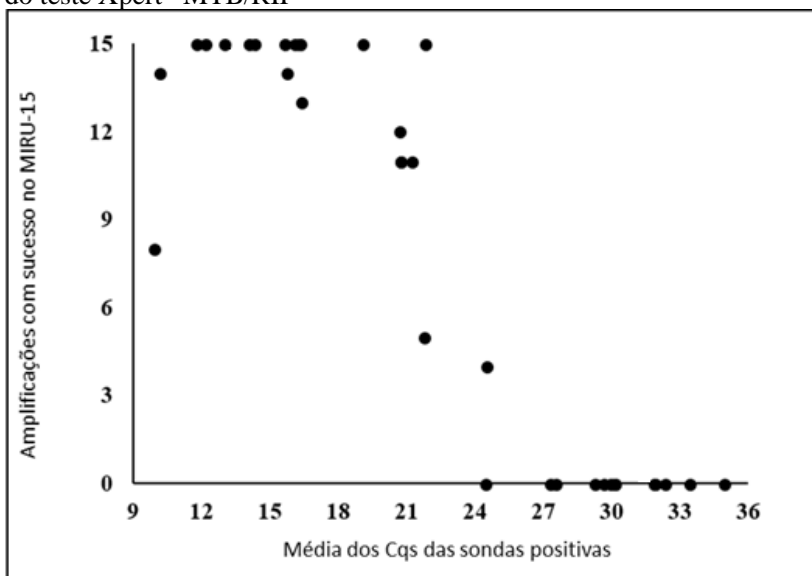
Para a realização do MIRU-15, foram tomados os restos de reação do teste Xpert® MTB/RIF de 36 amostras positivas. Em outras duas amostras as tentativas de amplificação foram realizadas apenas a partir do DNA extraído do isolado clínico, pois o resultado do teste Xpert® MTB/RIF foi “não detectado”, mas as amostras apresentaram crescimento de *Mtb* na cultura para micobactérias.

Entre as 36 amostras positivas, nove não foram positivas na cultura e apresentaram resultados “detectado *low*” ou “detectado *very low*”. Uma vez que a carga bacilar era muito baixa e o isolado clínico não estava disponível para extração do DNA, não foi possível amplificar nenhum dos 15 *loci* nessas amostras e, portanto, não foi possível obter o perfil de MIRU-15 (resultados não apresentados). Em uma amostra (24515) que também apresentou ausência de crescimento, porém resultado “detectado *medium*” no Xpert® MTB/RIF, foi possível amplificar 12 entre os 15 *loci* do MIRU. Os resultados dos três *loci* restantes foram indeterminados.

Em 11 amostras foi possível obter o perfil completo do MIRU-15 a partir dos restos do Xpert® MTB/RIF. Nas demais amostras não foi

possível amplificar todas as reações, faltando um *locus* em três amostras, dois *loci* em uma amostra, três *loci* em uma amostra e quatro *loci* em três amostras. As demais amostras (sete) não amplificaram diretamente dos restos em mais de cinco *loci*, sendo que em quatro delas não foi possível amplificar nenhum dos 15 *loci*. Conforme pode ser observado na tabela 31 e na figura 7, as amostras que apresentaram maiores médias dos ciclos de quantificação das sondas positivas do teste Xpert® MTB/RIF apresentaram maior dificuldade para amplificação.

Figura 7 - Relação entre a carga bacilar (Cq) e o sucesso nas amplificações do MIRU-15 com o DNA obtido diretamente do cartucho do teste Xpert® MTB/RIF



Legenda: Cqs: ciclos de quantificação.

Fonte: o autor.

Tabela 31 - Resultados do MIRU-15 e relação entre amplificação dos loci e ciclo médio de detecção do teste Xpert® MTB/RIF

Amostra	Resultado Xpert	Média detecção	Mtub 04	ETRC	MIRU 04	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	Mtub 21	Qub 11b	ETRA	Mtub 30	MIRU 26	MIRU 31	Mtub 39	Qub 26	Qub 4156
65470	High	11,8	2	3	2	3	4	3	4	5	3	4	4	3	3	7	3
64468	High	12,1	3	4	3	4	3	3	1	4	4	2	5	3	3	6	1
73564	High	13,0	4	4	2	3	4	3	2	4	2	2	3	3	1	7	2
91884	High	14,1	1	6	2	4	3	3	2	1	3	2	6	3	3	3	2
31879	High	14,3	2	4	2	1	4	1	3	4	2	1	4	3	2	8	2
45092	High	15,6	2	3	2	3	5	3	2	7	3	4	5	3	4	7	3
95584	High	16,1	1	4	2	4	3	3	2	1	3	2	6	3	3	3	2
44254	High	16,3	2	4	2	1	4	3	2	4	3	4	6	2	2	8	3
87554	High	16,3	3	4	3	2	2	4	1	3	4	2	4	3	3	9	2
33370	Medium	19,1	4	4	2	1	4	2	3	2	2	1	6	3	2	6	2
13194	Medium	21,8	2	3	2	3	6	3	3	4	3	2	5	3	3	4	3
5898	High	10,2	2	3	2	3	4	3	4	5	3	4	4	3	3	7	3
62760	High	15,8	3	4	2	4	4	3	3	2	2	1	4	3	2	6	3
70827	High	16,4	2	3	2	3	5	2	3	6	3	4	5	3	5	4	3
57070	Medium	20,7	3	4	3	4	4	3	1	5	4	2	5	3	3	4	2
24515	Medium	21,2	2	3	2	3	5	3	2	2	2	4	5	i	3	i	i
25708	Medium	20,7	4	3	2	4	3	3	3	3	3	4	4	3	3	8	3
33652	Medium	20,7	4	3	2	3	3	3	3	5	3	2	5	3	3	8	3
78755	High	9,9	4		1	4	3	3	3	2	2	1	5	2	2	6	2

(Continuação)

Amostra	Resultado Xpert	Média detecção	Mtub 04	ETRC	MIRU 04	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	Mtub 21	Qub 11b	ETRA	Mtub 30	MIRU 26	MIRU 31	Mtub 39	Qub 26	Qub 4156
65435	Medium	21,7	4	4	2	1	4	2	3	4	2	1	6	3	2	10	2
52491	Low	24,5	2	3	2	3	5	3	2	5	3	4	5	3	3	7	2
42187	Low	24,5	4	4	1	4	3	3	3	2	2	1	5	2	2	6	2
104819	Low	27,5	3	4	3	2	2	4	1	3	4	2	4	3	3	9	2
93827	Very low	29,3	3	4	2	4	4	3	3	2	2	1	5	2	2	8	2
49738	Very low	29,6	2	3	2	2	4	3	5	2	3	4	5	3	6	6	3
26071	ND	—	4	3	2	4	3	3	3	3	3	4	4	3	3	8	3
85228	ND	—	3	4	2	6	4	3	3	2	2	1	5	3	2	7	3

Legenda: ND: Não detectado; i: indeterminado. Obs.: o fundo negro denota os *loci* das amostras em que foi possível amplificar e determinar o alelo somente a partir do isolado clínico.

Fonte: o autor.

Foram encontrados 22 perfis diferentes de MIRU-15, sendo que quatro perfis foram compartilhados por duas amostras cada, resultando em um HGDI para o método de 0,988. O MIRU-15 demonstrou uma grande diversidade alélica para a maioria dos *loci*, especialmente para Qub26, Qub11b, MIRU40, Mtub04 e MIRU10 (HGDI > 0,700). O *loci* com menor diversidade alélica foi o MIRU31, que apresentou o HGDI de 0,271 (Tabela 32).

Tabela 32 - Diversidade alélica calculada por meio do Hunter-Gaston Discriminatory Index (HGDI – Índice Discriminatório de Hunter-Gaston)

<i>Loci</i>	Alelos obtidos	HGDI
Mtub04	1, 2, 3 ou 4	0,729
ETRC	3, 4 ou 6	0,544
MIRU04	1, 2 ou 3	0,382
MIRU40	1, 2, 3, 4 ou 6	0,744
MIRU10	2, 3, 4, 5 ou 6	0,712
MIRU16	1,2, 3 ou 4	0,390
Mtub21	1, 2, 3, 4 ou 5	0,698
Qub11b	1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7	0,829
ETRA	2, 3 ou 4	0,633
Mtub30	1, 2 ou 4	0,690
MIRU26	3, 4, 5 ou 6	0,670
MIRU31	2 ou 3	0,271
Mtub39	1, 2, 3, 4, 5 ou 6	0,638
Qub26	3, 4, 6, 7, 8, 9 ou 10	0,846
Qub4156	1, 2 ou 3	0,557

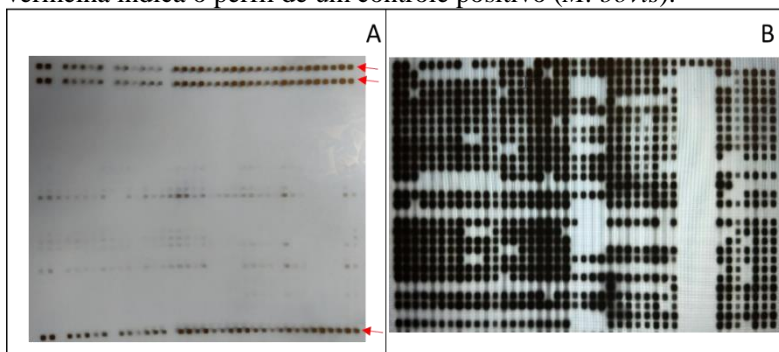
Fonte: o autor.

#### 4.3.8 Spoligotyping

Não foi possível obter os perfis do *spoligotyping* a partir dos restos do Xpert® MTB/RIF. Por outro lado, utilizando o DNA extraído pelo método do CTAB de *M. bovis* de um banco de isolados do laboratório (utilizado como controle positivo) foi

possível amplificar com sucesso (amostras sinalizadas com a flecha vermelha na Figura 8; A). Quando foram utilizados os DNAs extraídos pelo método do CTAB, após a cultura do isolado clínico, foi possível obter os perfis de *spoligotyping* (Figura 8; B).

Figura 8 - Resultados de spoligotyping realizado a partir dos restos do teste Xpert® MTB/RIF da amostra clínica (A) e a partir do DNA extraído após cultura do isolado clínico (B). A flecha vermelha indica o perfil de um controle positivo (*M. bovis*).



Fonte: o autor.

Foram obtidos 21 perfis diferentes, 5 famílias e 15 subfamílias dentre as 26 amostras. Assim, o HGDI obtido do spoligotyping foi de 0,985. Duas amostras apresentaram SIT, porém ainda não foram incluídas em nenhuma família e quatro amostras apresentaram perfil não compatível com nenhum isolado do banco SITVIT Database e, portanto, foram classificados como *unknown*.

#### 4.3.9 Análise combinada de spoligotyping e MIRU-15

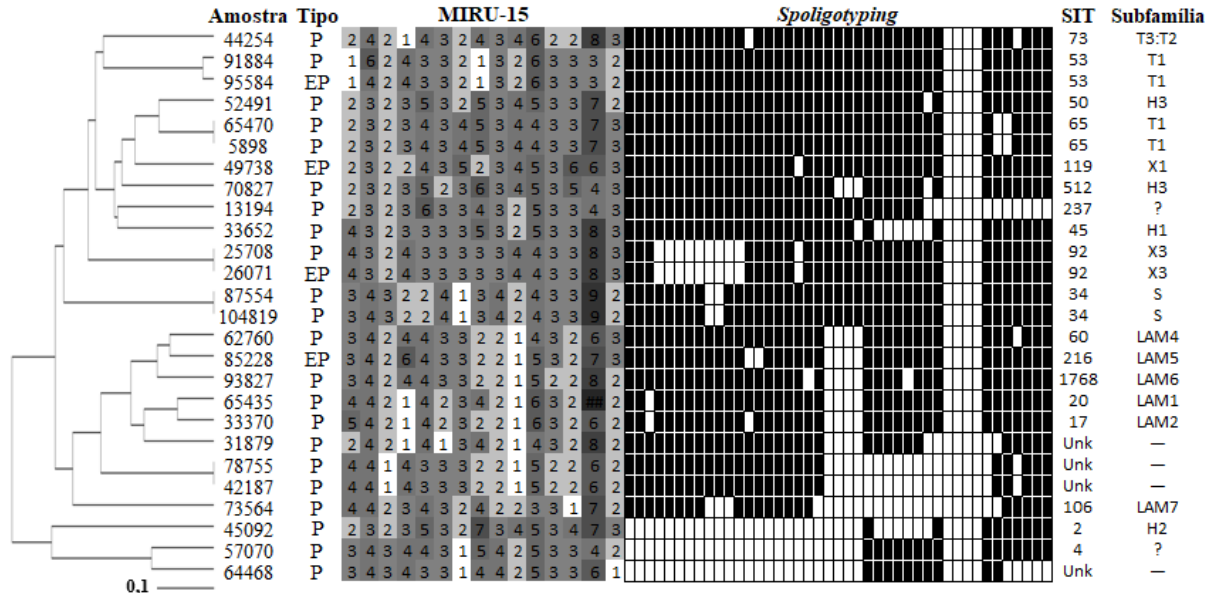
Na análise combinada de *spoligotyping* e MIRU-15, é possível observar a formação de quatro *clusters* contendo duas amostras em cada (Figura 9). Na verdade, as amostras 25708 e 26071 não formam um *cluster* verdadeiro pois foram isoladas do

mesmo paciente, sendo uma de amostra de escarro (pulmonar) e outra de líquido pleural (extrapulmonar).

O MIRU-15 apresentou uma variabilidade maior do que o *spoligotyping*, uma vez que todos os isolados que apresentaram o mesmo perfil no MIRU-15 tinham o mesmo perfil no *spoligotyping*, mas o contrário não foi verdadeiro. As amostras 91884 e 95584 apresentaram o mesmo perfil de *spoligotyping*, porém diferentes perfis de MIRU-15 pois diferiram em um *loci*.

Dessa forma, a diversidade alélica dos dois métodos combinados, calculado pelo HGDI, foi igual à do MIRU-15 (0,988).

Figura 9 - Análise combinada de MIRU-15 e spoligotyping utilizando o dendrograma de similaridade UPGMA



Legenda: P: amostra pulmonar; EP: amostra extrapulmonar; SIT: *Shared International Type*; unk: *unknown*. Fonte: o autor.



#### 4.3.10 Sumário dos resultados do CE-II

Os resultados mais relevantes encontrados foram:

- O método de descontaminação NALC-NaOH foi padronizado e nas análises preliminares e com um baixo número de amostras, mostrou-se superior ao método de Ogawa-Kudoh;

- Na cultura líquida e na cultura sólida houve o crescimento de 17/19 e 18/19 amostras pulmonares e 3/4 e 4/4 amostras extrapulmonares de pacientes com TB;

- Em participantes sem histórico de TB prévia, a sensibilidade e a especificidade da baciloscopia foram de 80,0% (IC95 51,9-95,7%) e 98,5% (IC95 94,5-99,8%) em amostras pulmonares. Nessas mesmas amostras, o teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF demonstrou sensibilidade de 100,0% (IC95 78,2-100,0%) e especificidade de 96,9% (IC95 92,3-99,2%);

- Nas amostras pulmonares dos participantes com TB prévia, a sensibilidade e a especificidade da baciloscopia foram de 100,0% (IC95 47,8-100,0%) e 93,1% (IC95 77,2-99,2%). A sensibilidade e a especificidade do teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF foram de 100,0% (IC95 47,8-100,0%) e 82,8% (IC95 64,2-94,2%).

- Em amostras extrapulmonares incluídas no CE-II a baciloscopia apresentou sensibilidade de 25,0% (IC95 0,6-80,6%) e especificidade de 100,0% (IC95 95,7-100,0%). A sensibilidade e especificidade do teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF foram de 50,0% (IC95 6,8-93,2%) e 98,8% (IC95 93,5-100,0)

- No CE-II, a sensibilidade do teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF em amostras pulmonares com baciloscopia positiva e com baciloscopia negativa foi de 100,0%.

- No CE-II, apenas duas amostras apresentaram resultado detectado para resistência à rifampicina. As duas amostras foram resistentes à isoniazida e à rifampicina. O teste teve sensibilidade de 100,0% (IC95 15,8-100,0%) e especificidade também de 100,0% (IC95 84,6-100,0%) em comparação ao teste fenotípico MGIT;

- No MIRU-15, a maioria dos *loci* das amostras com resultado detectado no Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF com Cq menor ou igual a 21 foram amplificadas com sucesso. Não foi possível fazer o *spoligotyping* a partir do DNA genômico obtido dos restos de reação do Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF.

- Houve a formação de quatro *clusters*, sendo um deles formado por dois isolados clínicos obtidos do mesmo paciente, um de uma amostra de escarro e outro de líquido pleural.

## **5 CAPÍTULO EXPERIMENTAL III – DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE PCR QUANTITATIVA PARA DETECÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis***

### **5.1 OBJETIVOS**

#### **5.1.1 Objetivo Geral**

Desenvolver e otimizar um teste para detecção de *M. tuberculosis* por meio de PCR quantitativa

#### **5.1.2 Objetivos específicos**

- Avaliar quatro diferentes protocolos de extração de DNA de *M. tuberculosis* em amostras clínicas;
- Desenvolver um teste para detecção da TB por PCR quantitativa;
- Otimizar a concentração dos iniciadores e das sondas e a temperatura de pareamento dos iniciadores;
- Avaliar a eficiência dos iniciadores e o limite de detecção do método.

### **5.2 METODOLOGIA**

#### **5.2.1 Extração do DNA**

Para a extração do DNA foram testados quatro protocolos diferentes utilizando uma suspensão de Mtb H37Rv com contagem aproximada de  $10^3$  UFC/mL e um *pool* de amostras clínicas positivas na cultura. Essas amostras foram descontaminadas pelo método NALC/NaOH e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento dos testes de extração, quando foram reunidas em um tubo único para realização dos procedimentos.

Para o preparo da suspensão de Mtb H37Rv, uma alçada (10  $\mu\text{L}$ ) de bactérias foi semeada em meio Middlebrook 7H9-OADC com glicerol a partir de uma colônia de bactéria crescida em meio Lowenstein-Jensen. Após sete a nove dias de crescimento em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  no meio 7H9-OADC, período em que a bactéria está na metade da fase exponencial, a suspensão de bactérias foi diluída em NaCl 0,85% até obtenção de uma suspensão de bactérias com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, determinada com auxílio do leitor

de densidade óptica Densichek Plus (Biomérieux, França). A partir dessa suspensão, foram feitas diluições sucessivas 1/10 ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ). Foram semeados 50  $\mu\text{L}$  em Middlebrook 7H10-OADC em triplicata das diluições  $10^{-5}$  a  $10^{-2}$  para conferir a contagem de Mtb e utilizou-se a diluição  $10^{-4}$  para extração do DNA.

Para conferência e semiquantificação da presença de DNA de Mtb, o *pool* de amostras e a suspensão H37Rv foram submetidas ao teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF.

Na extração de DNA das amostras foi utilizado o kit ReliaPrep Blood gDNA Miniprep System (Promega, EUA) com adaptações (pérolas de zircônia e equipamentos para melhoria da lise).

A partir suspensão de Mtb  $10^{-4}$  e do *pool* de amostras positivas, foram pipetados 250  $\mu\text{L}$  (protocolos A e C) ou 300  $\mu\text{L}$  (protocolos B e D) em triplicata em microtubos de 2 ml com tampa de rosca contendo cerca de 200 mg de pérolas de zircônia de 0,1 mm (protocolos A e B) ou de 0,5 mm (protocolos C e D) (Sigma Aldrich, EUA). Os microtubos foram incubados a  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos para inativação do bacilo.

A descrição simplificada dos protocolos consta no Quadro 4. Nos protocolos A e C, foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de proteinase K e 312  $\mu\text{L}$  de tampão de lise celular (CLD – *Cell Lysis Buffer*), com homogeneização entre as duas adições. Os microtubos foram incubados a  $56^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos para atividade da proteinase K e submetidos ao vórtex por 60 segundos para lise física. Após resfriamento, foram pipetados 420  $\mu\text{L}$  em um novo microtubo, ao qual foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação (BBA – *Binding Buffer*). O microtubo foi agitado em vórtex por 10 segundos e pipetou-se todo o conteúdo na coluna ReliaPrep. A coluna contendo um tubo de recolhimento de resíduos no fundo foi centrifugada por 1 minuto a 20.800 g. O tubo de recolhimento foi trocado, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  da solução de lavagem da coluna (CWD – *Column Wash Solution*) e a coluna foi novamente centrifugada por 3 minutos a 20.800 g. Após mais dois ciclos de lavagem e centrifugação, a coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Foram pipetados 50  $\mu\text{L}$  de água livre de nucleases na coluna, que foi centrifugada por 1 minuto a 20.800 g. A coluna foi descartada e o DNA extraído armazenado à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Nos protocolos B e D, após a incubação para inativação do bacilo, os tubos foram colocados no equipamento *bead beater* (batedor de pérolas, em tradução literal) Precellys 24 (Bertin Instruments, França), que tem como objetivo melhorar a eficiência da lise celular em comparação a outros métodos de agitação. No equipamento, os tubos foram submetidos à três ciclos de 60 segundos de agitação a 100 Hz

(6.000 oscilações por minuto) com intervalos de 30 segundos sem agitação. Em um tubo novo de 1,5 mL foram adicionados 20 µL de proteinase K, 200 µL da amostra da etapa anterior (amostra lisada no *bead beater*) e 250 µL do CLD, com homogeneização entre as adições. Após incubação a 56°C por 10 minutos, foram adicionados 250 µL do BBA no microtubo. Os microtubos foram agitados em vórtex e todo o seu conteúdo foi transferido para uma coluna ReliaPrep. A lavagem da coluna e a recuperação do DNA foram feitas da mesma forma que nos protocolos A e C.

Quadro 4 - Etapas realizadas nos protocolos de extração de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de amostras clínicas

Etapa da extração	Protocolo			
	A	B	C	D
Inativação térmica	✓	✓	✓	✓
Lise física vórtex com pérolas de zircônia de 0,1 mm	✓			
Lise física Precellys 24 com pérolas de zircônia de 0,1 mm		✓		
Lise física vórtex com pérolas de zircônia de 0,5 mm			✓	
Lise física Precellys 24 com pérolas de zircônia de 0,5 mm				✓
Lise química e purificação por coluna de sílica	✓	✓	✓	✓

Fonte: o autor

Para avaliação dos métodos de extração foi realizada uma qPCR IS6110-CIA das triplicatas dos protocolos A a D, após otimização dos parâmetros da qPCR.

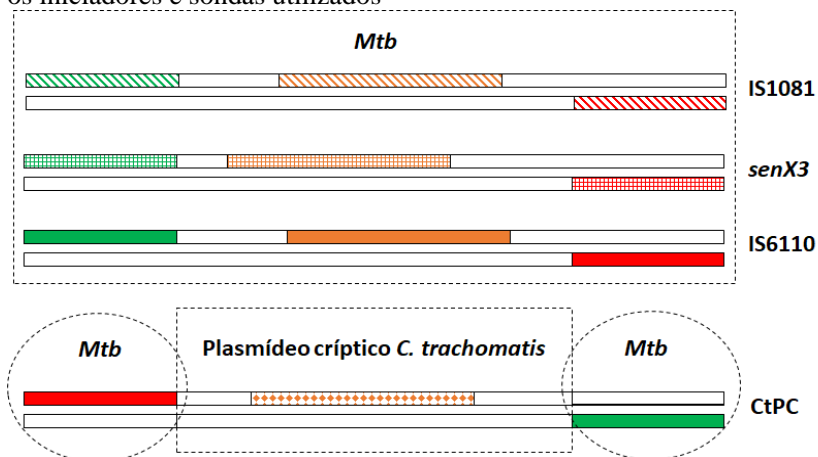
### 5.2.2 Desenvolvimento e validação da qPCR in house

Com o objetivo de desenvolver um teste de qPCR para diagnóstico da TB, foram definidos que os alvos utilizados seriam as seqüências de inserção IS6110 e IS1081 e o gene *senX3*.

Além disso, foi sintetizado um oligonucleotídeo de mesmo tamanho do produto da reação IS6110 (93 pb) para utilizar como controle interno de amplificação (CIA) da reação com o intuito de detectar possíveis inibidores da qPCR. Esse oligonucleotídeo sintético, denominado C+CtPC, contém, no início e no fim, bases complementares aos iniciadores utilizados na reação da IS6110 e o meio formado por

uma região do plasmídeo críptico de *Chlamydia trachomatis* (Figura 10).

Figura 10 - Estratégia de detecção de CMTB por qPCR demonstrando os iniciadores e sondas utilizados



Legenda: Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*.

Fonte: o autor.

Esses alvos foram divididos duas reações de qPCR: a primeira contendo duas sondas de hidrólise (uma o alvo IS6110 e outra para o oligonucleotídeo sintético CIA C+CtPC), mas apenas um par de iniciadores (IS6110-f e IS6110-r), que foi denominada de reação IS6110-CIA, e a segunda uma duplex contendo os iniciadores e sondas para os alvos IS1081 e *senX3*, denominada IS1081-*senX3*.

Na literatura normalmente a nomenclatura “duplex” ou “multiplex” refere-se à utilização de mais de um par de iniciadores, o que não ocorre na reação IS6110-CIA, que utiliza apenas os iniciadores IS6110-f e IS6110-r. Por isso, foi adotado o termo “reação combinada” ou “qPCR combinada” para as reações que amplificam mais do que um alvo.

### 5.2.2.1 Desenho dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos para as reações IS6110, IS1081 e *senX3* foram desenhados com auxílio da ferramenta PrimerQuest, (IDT, EUA) utilizando as sequências alvos a partir do genoma de Mtb H37Rv (acesso no Genbank: AL123456.3).

Foram utilizados os seguintes parâmetros: concentração de sal monovalente ( $\text{Na}^+$ ) de 50 mM, concentração de iniciadores e das sondas de hidrólise de 200 nM, concentração de magnésio de ( $\text{Mg}^{++}$ ) 3 mM, concentração de dNTP de 0,8 mM, tamanho do produto amplificado de 90 a 120 pb, temperatura de *melting* dos iniciadores de 59 a 65°C e das sondas de hidrólise de 65 a 70°C.

Para as qPCR cujos alvos eram IS6110, IS1081 e *senX3*, foram obtidos 15 a 20 conjuntos de iniciador *forward*, iniciador *reverse* e sonda no programa PrimerQuest para cada alvo. Os conjuntos foram submetidos ao programa OligoAnalyzer para verificar a formação de estruturas secundárias (*hairpins* e dímeros). Os conjuntos que apresentaram os valores de  $\Delta G$  mais próximos de zero, preferencialmente acima de -5,00, foram selecionados. Para seleção final, foi levado em conta a maior proximidade em relação ao iniciador de mesma orientação, uma vez que quanto mais próximo, melhor a emissão de fluorescência (LUNGE et al., 2002).

A especificidade dos iniciadores para micobactérias do CMTB foi analisada por alinhamento múltiplo com sequências disponíveis no GenBank utilizando a ferramenta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

O oligonucleotídeo sintético utilizado como CIA foi desenhado com base na sequência do plasmídeo críptico de *C. trachomatis* (acesso no GenBank: X06707.3). Como os iniciadores para as reações para a IS6110 e para o CIA são os mesmos, o desenho da sonda de hidrólise do controle de inibição foi feito após obtenção dos oligonucleotídeos da qPCR para a IS6110, mas utilizando os mesmos critérios e programa das demais qPCR.

#### 5.2.2.2 Desenvolvimento e otimização da qPCR

Em todas as reações de qPCR foi utilizado o kit GoTaq Probe qPCR Master Mix (código do fornecedor A6102; Promega, EUA), que vem concentrado 2x, necessitando apenas a adição dos iniciadores, sondas e amostra contendo o DNA extraído. Na reação IS6110-CIA foi adicionado também o oligonucleotídeo C+CtPC. Nas etapas de desenvolvimento e otimização foi utilizado DNA de *Mtb H37Rv* extraído pelo método do CTAB (conforme item 4.2.8.) na diluição em que amplificava entre os ciclos 25 e 30 na reação IS1081-*senX3*. A concentração do DNA foi mensurada no equipamento Nanovue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences, EUA).

Para as reações de qPCR de diagnóstico (IS6110, IS1081 e *senX3*), foram adquiridas sondas de hidrólise contendo duplos “abafadores de sinal” (*quenchers*) para diminuir a linha de base e, conseqüentemente, aumentar a sensibilidade analítica. Para a sonda do CIA foi adquirida uma sonda de hidrólise apenas com *quencher* simples (IDT, EUA).

Todos os ensaios de otimização foram realizados em triplicata com as reações realizadas em microtubos em tiras de oito unidades (código do fornecedor RB781326; Brand, Alemanha) no termociclador para qPCR MasterCycler Realplex4 (Eppendorf, Alemanha)

### 5.2.2.3 Concentração dos iniciadores e sondas

Nas instruções do kit GoTaq Probe qPCR Master Mix o fabricante recomenda a utilização de 200 a 1.000 nM de cada um dos iniciadores e 100 a 300 nM das sondas de hidrólise. Por esse motivo inicialmente foram testadas as concentrações dos iniciadores em reações individuais (simplex) e com concentrações de iniciadores *forward* e *reverse* (200, 400 e 800 nM). Após determinação das concentrações ótimas mínimas, o ensaio foi repetido em reações individuais e reações combinadas (conjunto iniciadores e sonda IS6110 e sonda CtPC para a reação IS6110-CIA e conjunto iniciadores e sonda IS1081 e *senX3* para a reação IS1081-*senX3*).

Geralmente a concentração da sonda de hidrólise é de 50% da concentração de cada primer. Na otimização da concentração das sondas foram feitas qPCR com as concentrações de iniciadores otimizadas e concentração de sondas de hidrólise de 20%, 50% e 100% da concentração dos iniciadores para a duplex IS1081-*senX3* e 12,5%, 25% e 50% para a reação IS6110-CIA.

### 5.2.2.4 Temperatura de pareamento dos iniciadores

As condições de temperatura de pareamento dos iniciadores foram otimizadas por meio de um gradiente de temperatura variando de 50 a 60°C. A qPCR utilizando as concentrações de iniciadores e sondas otimizadas nas etapas anteriores foi realizada com a seguinte programação: 95°C por 2 minutos e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos na temperatura de 50 a 60°C (gradiente) e 15 segundos a 60°C. As temperaturas do gradiente foram: 50,0°C, 51,1°C, 52,6°C, 54,2°C, 55,9°C, 57,4°C, 58,9°C e 60,0°C.

### 5.2.2.5 Eficiência dos iniciadores

As eficiências dos conjuntos de iniciadores IS6110, IS1081 e *senX3* foram feitas por meio de diluições seriadas 1/10 utilizando DNA de *Mtb* extraído pelo método de CTAB em reações combinadas IS6110-CIA e IS1081-*senX3*. Para cada conjunto de iniciadores foram preparadas diluições utilizando tampão Tris-EDTA 0,2X (TE) ou *pool* de DNA de amostras clínicas pulmonares e extrapulmonares como diluentes.

A eficiência dos iniciadores IS6110 para amplificar o oligonucleotídeo sintético C+CtPC foi feita da mesma forma, mas utilizando somente a reação CIA com o C+CtPC diluído em TE 0,2X, uma vez que essa reação é justamente utilizada para detectar possíveis inibidores presente no DNA de amostras clínicas.

Após obtenção da média dos Cq de cada diluição, foi plotado um gráfico do logaritmo da concentração (eixo x) *versus* Cq (eixo y) para obtenção do R<sup>2</sup> e equação da reta. A eficiência foi obtida por meio da fórmula  $E = -1 + 10^{(-1/A)}$ , sendo “E” a eficiência dos iniciadores e “A” a inclinação da reta, obtida a partir da equação da reta ( $y = Ax + B$ ).

### 5.2.2.6 Limite de detecção

Para o cálculo do limite de detecção foram aproveitadas curvas empregadas na determinação das eficiências dos iniciadores. A partir da menor diluição detectada, foram preparadas outras diluições seriadas 1/2 até que houvesse um resultado negativo. Foram feitas dez reações conjuntas (IS6110-CIA e IS1081-*senX3*). O limite de detecção foi a menor diluição em que todas as reações foram positivas.

A relação entre a concentração de DNA e o número de cópias foi feita por meio da fórmula  $n = (C \times N_A) / (T \times PM \times 10^9)$ , sendo *n* o número de cópias, *C* a concentração do DNA (ng/μL), *N<sub>A</sub>* o número de Avogadro ( $6,022 \times 10^{23}$ ), *T* o número de pares de base no genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (4.411.352), *PM* o peso molecular aproximado da dupla fita de DNA (650 g/mol) e  $10^9$  o fator de correção de unidades.



## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Extração de DNA de amostras clínicas

O *pool* de amostras e a suspensão de Mtb  $10^{-4}$  apresentaram resultado detectado no teste Xpert® MTB/RIF, tendo o *pool* de amostras resultado “*high*” e a suspensão de Mtb resultado “*low*”.

Na quantificação da suspensão de Mtb foram obtidos os resultados da tabela 33. Assim, a diluição  $10^{-4}$  apresentou um resultado real de  $2,43 \times 10^3$  UFC/mL e, pela média das diluições com resultados válidos ( $10^{-4}$  e  $10^{-3}$ ), a suspensão de bactérias com turbidez equivalente ao tubo 0,5 na escala de McFarland continha  $2,35 \times 10^7$  UFC/mL.

Tabela 33 - Resultados da quantificação para caracterização da suspensão de *Mycobacterium tuberculosis*

Diluição	Contagem (UFC/50 $\mu$ L)			Resultado (UFC/mL)
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	
$10^{-2}$	Inc.	Inc.	Inc.	—
$10^{-3}$	Inc.	Inc.	Inc.	—
$10^{-4}$	133	110	123	$2,43 \times 10^3$
$10^{-5}$	6	16	22	$2,27 \times 10^2$
0,5 McFarland	—			$2,35 \times 10^7$

Legenda: UFC: unidades formadoras de colônia; Inc.: incontáveis colônias.

As características (carga bacilar) de cada uma das amostras utilizadas no *pool* constam na Tabela 34.

Tabela 34 - Características das amostras utilizadas no pool para testes de extração de DNA

Amostra	Resultados dos testes diagnósticos para tuberculose		
	Cultura	Baciloscopia	Xpert® MTB/RIF
8786	++	++	Detectado <i>medium</i>
9381	+++	+++	Detectado <i>medium</i>
24210	+	+	Detectado <i>medium</i>
24040	+++	+++	Detectado <i>medium</i>
17316	++	++	Não realizado
37038	+++	+++	Detectado <i>high</i>
42091	+++	+++	Detectado <i>medium</i>
35585	++	++	Detectado <i>high</i>

Fonte: o autor.

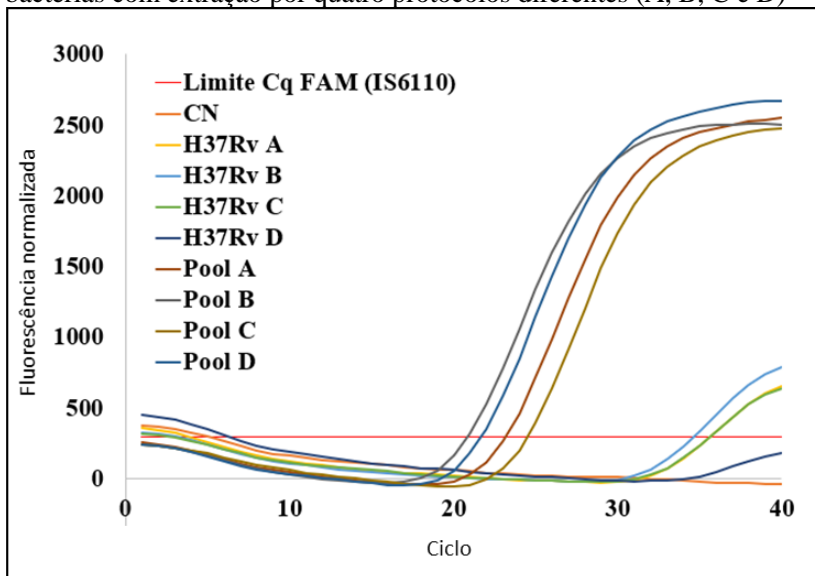
Em relação aos métodos de extração testados, todos forneceram resultado detectado, exceto duas replicatas da suspensão de Mtb H37Rv com o protocolo D. O protocolo B (se diferenciou dos demais pela etapa de lise física no *bead beater* com pérolas de zircônia de 0,1 mm) foi o que forneceu os melhores resultados tanto para a suspensão de Mtb H37Rv quando para o *pool* de amostras clínicas (Tabela 35 e Figura 11).

Tabela 35 - Resultados da qPCR IS6110 com extração de DNA de M. tuberculosis utilizando quatro protocolos diferentes (A, B, C e D)

Amostra	Protocolo	Cq da reação IS6110 (média ± DP)
Mtb H37Rv 2,43x10 <sup>3</sup> UFC/mL	A	35,77 ± 0,97
	B	34,52 ± 1,05
	C	35,96 ± 1,75
	D	38,79*
<i>Pool</i> de amostras clínicas	A	23,24 ± 0,53
	B	20,90 ± 0,22
	C	24,61 ± 0,36
	D	22,11 ± 0,02

Legenda: Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*. \*: apenas uma replicata foi positiva. Fonte: o autor.

Figura 11 - Amplificação a cada ciclo da qPCR IS6110-CIA para detecção de *M. tuberculosis* do pool de amostras e da suspensão de bactérias com extração por quatro protocolos diferentes (A, B, C e D)



Legenda: H37Rv: suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv  $2,43 \times 10^3$  UFC/mL; Pool: pool de amostras clínicas; CN: controle negativo; Cq: ciclo de quantificação.

Fonte: o autor.

### 5.3.2 Padronização e otimização da qPCR multiplex *in house*

#### 5.3.2.1 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos selecionados constam na tabela 36. Conforme pode ser observado nas Tabelas 37 e 38, as estruturas secundárias mais estáveis (com valores de  $\Delta G$  mais negativos) foram -3,47 para a reação IS6110-CIA e -5,12 para a reação IS1081-*senX3*.

Tabela 36 - Sequências e principais características dos oligonucleotídeos selecionados para utilização nas qPCR in house para detecção de *M. tuberculosis*

Nome	Sequência	T <sub>m</sub> (°C)	Tamanho do produto
IS6110-f	5'-ATGGCGAACTCAAGGAGC-3'	62	
IS6110-r	5'-CCTCACGGTTCAGGGTTAG-3'	61	93 pb
IS6110-TQ	5'- <u>FAM</u> -AACTACGGT/ <u>ZEN</u> /GTTTACGGTGCCCG- <u>IBFQ</u> 3'	68	
C+CtPC	5'-ATGGCGAACTCAAGGAGCGGGAG ATATCTTAATAGATTGACCAGGTCT TCTTCCAAACTTCTGATTTTCAAG GTCTAACCCCTGAACCGTGAGG-3'	-	93 pb
CtPC-TQ	5'- <u>ROX</u> -TGACCAGGTCTTCTTCCAAACTTCTGA- <u>IBRQ</u> -3'	67	
IS1081-f	5'-TGCTACCTGCTGGGAGTAT-3'	62	
IS1081-r	5'-TGATCGACACTTGCGACTTG-3'	62	91 pb
IS1081-TQ	5'- <u>JOE</u> -CCTGGTCTGA/ <u>ZEN</u> /AACACTTGGTGTGACA- <u>IBFQ</u> -3'	68	
<i>senX3</i> -f	5'-CCGAGTTGATCGAGCTATCC-3'	61	
<i>senX3</i> -r	5'-GAAATCGCTCCGACACAATC-3'	62	94 pb
<i>senX3</i> -TQ	5'- <u>FAM</u> -CGGCTACCC/ <u>ZEN</u> /AATATGACCGACGT- <u>IBFQ</u> -3'	68	

Legenda: T<sub>m</sub>: temperatura de *melting*; pb: pares de base. As letras sublinhadas indicam modificações nos oligonucleotídeos (fluoróforo na porção 5' e abafadores de sinal no meio e na porção 3').

Fonte: o autor.

Tabela 37 - Valores das interações com menores  $\Delta G$  (hairpins ou dímeros) entre os oligonucleotídeos das qPCR IS6110 e CIA

Oligonucleotídeo	IS6110-f	IS6110-TQ	IS6110-r	CtPC-TQ
IS6110-f	0,04	-3,00	-1,65	-1,81
IS6110-TQ		-3,47	-3,47	-2,02
IS6110-r			-1,46	-1,92
CtPC-TQ				-2,78

Fonte: o autor

Tabela 38 - Valores das interações com  $\Delta G$  mais negativos (hairpins ou dímeros) entre os oligonucleotídeos das qPCR *senX3* e IS081

Oligonucleotídeo	<i>senX3</i> -f	<i>senX3</i> -TQ	<i>senX3</i> -r	IS1081-f	IS1081-TQ	IS1081-r
<i>senX3</i> -f	-3,55	-3,47	-1,97	-1,53	-3,55	-3,55
<i>senX3</i> -TQ		-3,47	-3,47	-4,88	-3,76	-1,97
<i>senX3</i> -r			-1,97	-1,43	-3,32	-5,12
IS1081-f				0,91	-1,20	0,27
IS1081-TQ					-3,55	-4,90
IS1081-r						-3,55

Fonte: o autor

Nas análises de especificidade *in silico* realizadas na ferramenta Primer BLAST, todos os pares de iniciadores demonstraram especificidade somente para isolados do complexo *M. tuberculosis*.

### 5.3.2.2 Concentração dos iniciadores e sondas de hidrólise

Não houve diferença entre o  $C_q$  obtido nas concentrações de 200, 400 e 800 nM em nenhuma das quatro reações, conforme pode ser observado na Tabela 39. Ainda que a fluorescência tenha sido maior nas concentrações maiores de iniciadores, é possível observar na Figura 12 que a menor concentração testada (200 nM) já fornece a quantidade suficiente de iniciadores para as reações.

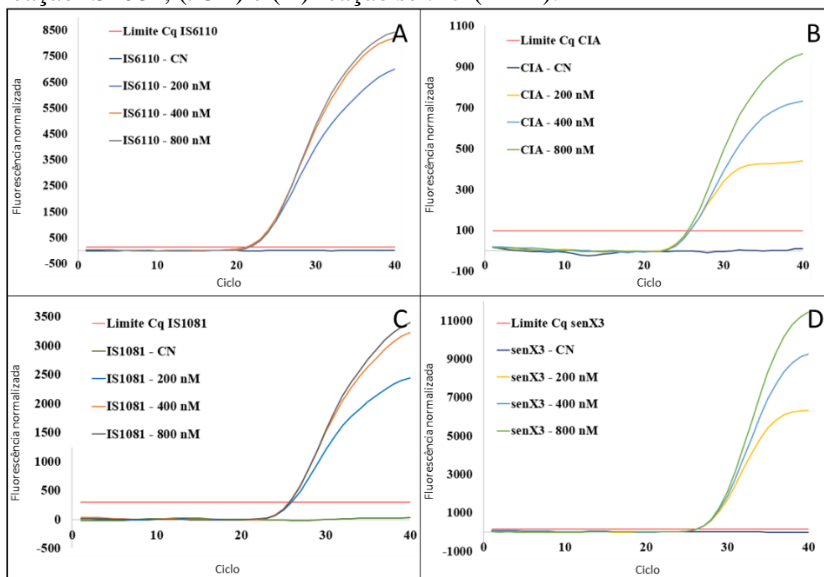
Tabela 39 - Ciclos de quantificação (Cq) obtidos na otimização da concentração dos iniciadores nas reações individuais

Reação	Concentração dos iniciadores (nM)	Média dos Cqs
IS6110	200	21,37±0,17
	400	21,32±0,06
	800	21,83±0,01
CIA	200	25,69±0,25
	400	25,77±0,08
	800	25,49±0,03
IS1081	200	25,94±0,04
	400	25,72±0,02
	800	25,75±0,04
<i>senX3</i>	200	26,29±0,11
	400	26,34±0,16
	800	26,28±0,03

Legenda: CIA: controle interno de amplificação.

Fonte: o autor.

Figura 12 - Média das fluorescências da qPCR para otimização da concentração dos iniciadores das reações individuais. (A) reação IS6110, detecção da sonda IS6110 (FAM); (B) reação CIA, (ROX); (C) reação IS1081, (JOE) e (D) reação *senX3* (FAM).



Legenda: CN: controle negativo; Cq: ciclo de quantificação.

Fonte: o autor.

Como a reação IS1081-*senX3* utiliza dois conjuntos de iniciador *forward*, iniciador *reverse* e sonda de hidrólise testou-se a reação conjunta em comparação com as duas reações individuais utilizando os iniciadores na concentração mínima efetiva, 200 nM de cada iniciador (Tabela 40 e Figura 13, C e D). Isso porque não há competição entre os alvos pelo mesmo par de iniciadores. Não houve mudança maior do que um ciclo no Cq entre as reações simplex e a reação duplex.

Por outro lado, como o controle interno de amplificação utiliza os mesmos iniciadores da IS6110 (IS6110-f e IS6110-r), na reação IS6110-CIA testou-se a reação conjunta em comparação com as duas reações individuais, porém novamente nas concentrações de 200, 400 e 800 nM (Tabela 40 e Figura 13, A e B). Caso haja amplificação da reação IS6110, não há importância do resultado da CIA pois ele está presente na reação para detecção de inibidores de PCR na amostra. Mesmo assim, optou-se por trabalhar com a concentração de 400 nM, pois na

concentração de 200 nM a detecção do CIA foi extremamente baixa, quase não atingindo o Cq (Figura 13, B).

Tabela 40 - Ciclos de quantificação (Cq) obtidos nas qPCR IS6110-CIA e IS1081-senX3 em reações individuais e combinadas na etapa de otimização da concentração dos iniciadores

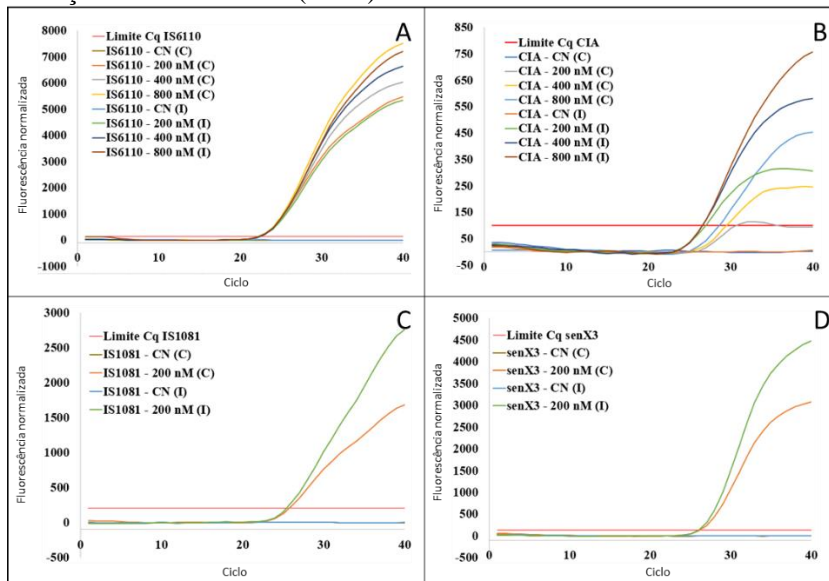
qPCR	Concentração dos iniciadores (nM)	Média±DP dos Cqs	
		Reação individual	Reação combinada
IS6110	200	22,50±0,08	22,20±0,12
	400	22,48±0,01	22,46±0,05
	800	22,31±0,52	22,43±0,03
CIA	200	27,00±0,35	31,74±3,20
	400	26,64±0,39	29,51±0,84
	800	26,63±0,23	28,69±1,12
<i>senX3</i>	200	26,05±0,22	26,26±0,15

Legenda: CIA: controle interno de amplificação; DP: desvio padrão.

Fonte: o autor.



Figura 13 - Média das fluorescências da qPCR para otimização da concentração dos iniciadores das reações individuais e combinadas. (A) reação IS6110-CIA, detecção da sonda IS6110 (FAM); (B) reação IS6110-CIA, detecção da sonda CtPC (ROX); (C) reação IS1081-senX3, detecção da sonda IS1081 (JOE) e (D) reação IS1081-senX3, detecção da sonda senX3 (FAM).



Legenda: CN: controle negativo; C: reações combinadas; I: reações individuais.

Fonte: o autor.

Em relação às concentrações das sondas de hidrólise, foram feitos testes nas concentrações de 50, 100 e 200 nM em todas as combinações possíveis. Os resultados para as reações IS6110, IS1081 e *senX3* foram ligeiramente melhores em concentrações maiores, mas por uma questão de custos, optou-se por utilizar a concentração de 100 nM. Por outro lado, a reação do CIA foi prejudicada em baixas concentrações e não afetou a performance da reação IS6110 na maior concentração. Pelos motivos apresentados, foi escolhida a concentração de 200 nM da sonda CtPC-TQ na reação IS6110-CIA (Tabela 41 e figura 14).

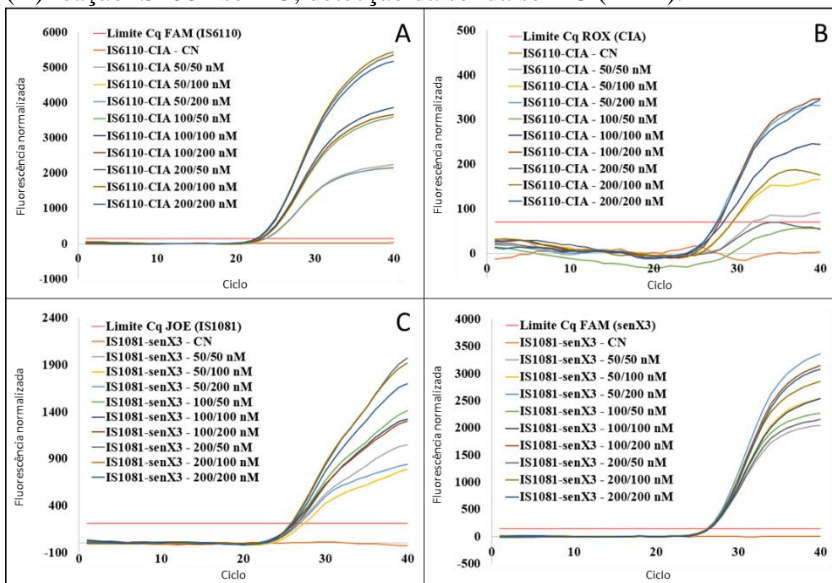
Tabela 41 - Ciclos de quantificação (Cq) obtidos nas qPCR IS6110-CIA e IS1081-senX3 em reações combinadas na etapa de otimização da concentração das sondas de hidrólise

Concentração das sondas	Média±DP dos Cqs			
	IS6110	CIA	IS1081	<i>senX3</i>
50/50	23,72±0,08	35,16±6,30	26,62±0,28	26,46±0,04
50/100	23,90±0,10	29,46±0,45	27,42±0,08	26,41±0,01
50/200	23,71±0,26	27,61±0,24	26,92±0,11	26,19±0,11
100/50	23,29±0,05	*	26,20±0,04	26,47±0,01
100/100	23,14±0,04	28,41±0,01	26,30±0,10	26,51±0,04
100/200	23,24±0,12	27,96±0,11	26,56±0,07	26,33±0,03
200/50	22,88±0,04	*	25,94±0,18	26,47±0,08
200/100	22,76±0,02	29,47±0,01	25,83±0,01	26,24±0,09
200/200	22,60±0,01	27,78±0,28	26,06±0,04	26,44±0,25

Legenda: DP: desvio padrão; \*: apenas uma das replicatas foi positiva

Fonte: o autor.

Figura 14 - Média das fluorescências da qPCR para otimização das sondas em reações combinadas. (A) reação IS6110-CIA, detecção da sonda IS6110 (FAM); (B) reação IS6110-CIA, detecção da sonda CtPC (ROX); (C) reação IS1081-senX3, detecção da sonda IS1081 (JOE) e (D) reação IS1081-senX3, detecção da sonda senX3 (FAM).



Legenda: CN: controle negativo; Cq: ciclo de quantificação.

Fonte: o autor.

### 5.3.2.3 Temperatura de pareamento

Não foram observadas diferenças no Cq nas diferentes temperaturas avaliadas para as os alvos IS6110, CIA e *senX3* (Tabela 42 e Figura 15). Para o alvo IS1081, notou-se um pequeno aumento do Cq em temperaturas mais baixas. Assim, definiu-se a temperatura de pareamento a 60°C como a melhor a ser utilizada.

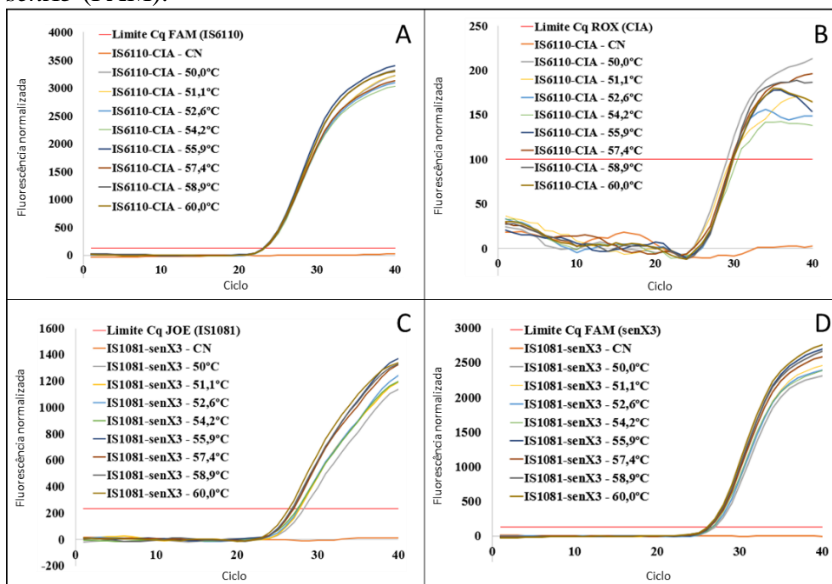
Tabela 42 - Ciclos de quantificação (Cq) obtidos nas qPCR IS6110-CIA e IS1081-senX3 em diferentes temperaturas de pareamento.

Temperatura de pareamento (°C)	Média±DP dos Cqs			
	IS6110	CIA	IS1081	<i>senX3</i>
50,0	23,40±0,05	30,14±0,91	28,01±0,37	26,85±0,18
51,1	23,40±0,09	30,53±0,67	27,57±0,03	26,78±0,01
52,6	23,33±0,18	30,73±0,25	26,92±0,09	26,45±0,01
54,2	23,25±0,13	30,23±0,46	26,70±0,21	26,09±0,08
55,9	23,39±0,01	29,08±0,25	28,14±0,43	26,98±0,12
57,4	23,49±0,02	29,82±0,43	27,60±0,11	26,72±0,19
58,9	23,25±0,01	29,21±0,04	27,05±0,03	26,44±0,05
60,0	23,28±0,06	29,77±0,25	26,60±0,29	26,30±0,01

Legenda: DP: desvio padrão.

Fonte: o autor.

Figura 15 - Média das fluorescências da qPCR para otimização da temperatura de anelamento em reações combinadas. (A) reação IS6110-CIA, detecção da sonda IS6110 (FAM); (B) reação IS6110-CIA, detecção da sonda CtPC (ROX); (C) reação IS1081-senX3, detecção da sonda IS1081 (JOE) e (D) reação IS1081-senX3, detecção da sonda *senX3* (FAM).



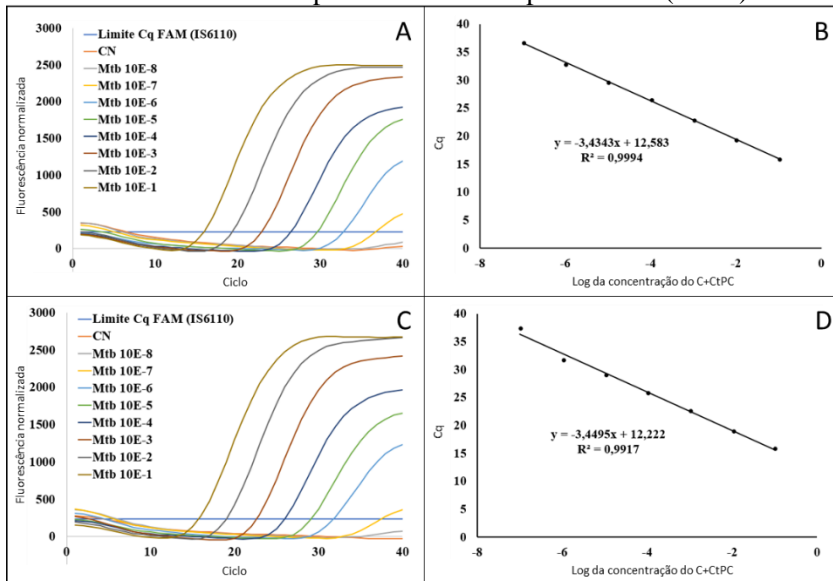
Legenda: CN: controle negativo; Cq: ciclo de quantificação.

Fonte: o autor.

#### 5.3.2.4 Eficiência dos iniciadores

As eficiências para as reações IS6110, IS1081 e *senX3* com o DNA de *Mtb* diluído em tampão TE 0,2X e em *pool* de DNA de amostras clínicas foram satisfatórias, ficando com valores que variaram entre 93,0% e 100,3% (Figuras 16 e 17).

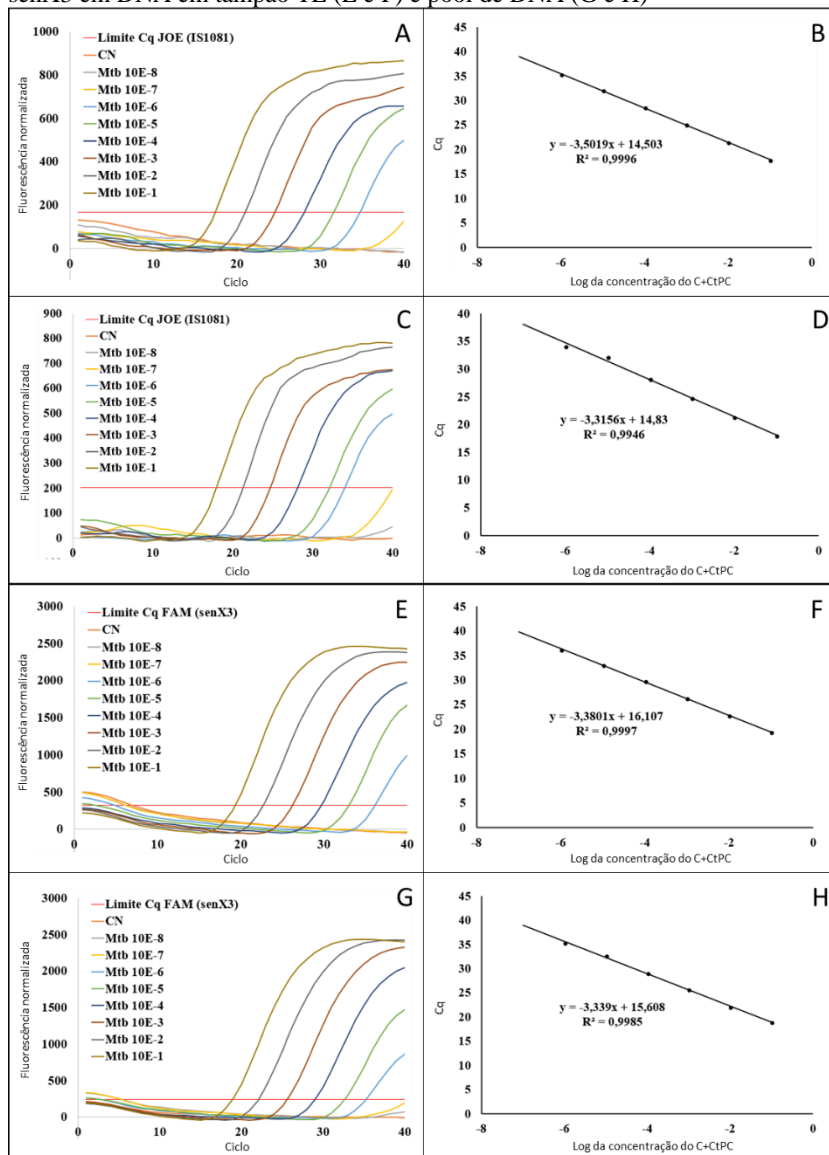
Figura 16 - Eficiência dos iniciadores IS6110 na reação IS6110-CIA com DNA de *Mtb* diluído em tampão TE (A e B) e diluído em pool de DNA extraído de amostras pulmonares e extrapulmonares (C e D).



Legenda: CN: controle negativo; Cq: ciclo de quantificação.

Fonte: o autor.

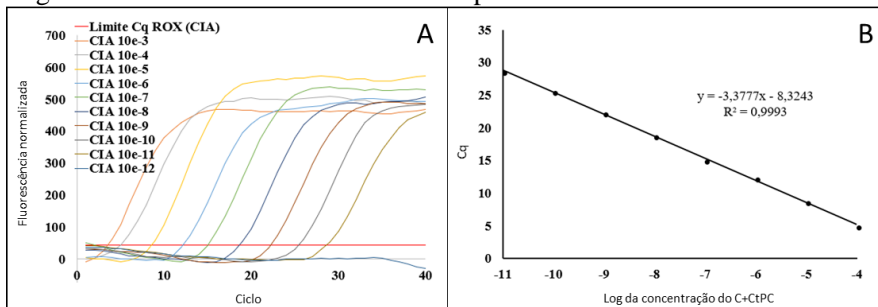
Figura 17: Eficiência dos iniciadores IS1081 na reação IS1081-senX3 com DNA de Mtb diluído em tampão TE (A e B) e diluído em pool de DNA extraído de amostras pulmonares e extrapulmonares (C e D) e eficiência dos iniciadores senX3 em DNA em tampão TE (E e F) e pool de DNA (G e H)



Legenda: CN: controle negativo; Cq: ciclo de quantificação. Fonte: o autor.

A eficiência dos iniciadores IS6110 para a amplificação da reação CIA foi de 97,6%, conforme pode ser observado na Figura 18.

Figura 18 - Eficiência dos iniciadores IS6110 na reação CIA com o oligonucleotídeo C+CtPC diluído em tampão TE.



Legenda: CN: controle negativo; Cq: ciclo de quantificação.

Fonte: o autor.

O resumo das eficiências de acordo com a reação e o diluente utilizado está na Tabela 43.

Tabela 43 - Resumo das eficiências das reações utilizadas para detecção da TB.

Reação	Diluente utilizado	Inclinação da reta	Eficiência
IS6110	Tampão TE	-3,4343	95,5
	Pool de DNA	-3,4495	94,9
CIA	Tampão TE	-3,3777	97,7
	Pool de DNA	-3,5019	93,0
IS1081	Tampão TE	-3,5019	93,0
	Pool de DNA	-3,3156	100,3
<i>senX3</i>	Tampão TE	-3,3801	97,6
	Pool de DNA	-3,3390	99,3

Fonte: o autor.

### 5.3.2.5 Limite de detecção

O DNA de Mtb utilizado nos testes para determinação do limite de detecção continha a concentração de 45 ng/μL. Como nas curvas obtidas nos experimentos de eficiência dos iniciadores o DNA de Mtb amplificou até a diluição 10<sup>-7</sup> para o alvo IS6110 e até 10<sup>-6</sup> para os alvos



IS1081 e *senX3* foram escolhidas o DNA na diluição  $10^{-7}$  para a reação IS6110-CIA e  $10^{-6}$  para a reação IS1081-*senX3*. As concentrações de DNA nas diluições  $10^{-7}$  e  $10^{-6}$  correspondem respectivamente a 4,5 fg/ $\mu$ L e 45 fg/ $\mu$ L. O DNA foi diluído novamente 1/2 e 1/4 e foram feitas 10 replicatas. Como para o alvo IS1081 todas as replicatas apresentaram resultado detectado, foram feitas 10 novas replicatas da reação IS1081-*senX3* diluindo o DNA 1/8 (tabela 44). Assim, os limites de detecção das reações IS6110, IS1081 e *senX3* foram de 4,5 fg/ $\mu$ L, 11,25 fg/ $\mu$ L e 22,5 fg/ $\mu$ L, respectivamente.

Tabela 44 - Resultados obtidos na determinação do limite de detecção das qPCR utilizadas para detecção da TB.

R	Cq dos alvos e suas diluições									
	IS6110 - $10^{-7}$			IS1081 - $10^{-6}$				<i>senX3</i> - $10^{-6}$		
	1	1/2	1/4	1	1/2	1/4	1/8	1	1/2	1/4
1	38,12	-	38,79	35,62	35,32	37,84	-	34,07	36,86	39,60
2	36,92	39,13	-	34,98	36,75	38,44	-	34,07	39,47	35,32
3	35,98	-	-	34,78	36,24	37,12	38,77	36,63	36,09	37,88
4	37,99	37,37	38,50	34,96	37,30	37,13	38,53	34,69	36,32	-
5	36,71	37,86	37,74	34,86	36,12	37,12	39,67	35,23	36,83	-
6	35,74	38,75	-	34,80	35,92	38,02	-	34,38	37,66	39,40
7	35,67	38,15	-	35,58	35,63	37,81	39,36	34,74	35,88	-
8	36,89	36,48	-	34,59	35,95	35,12	-	35,13	36,45	35,69
9	36,33	36,84	-	35,27	35,50	36,52	38,09	35,00	35,99	34,88
10	38,80	38,81	-	34,08	35,35	36,17	37,22	34,93	35,51	36,44

Legenda: R: replicata; Cq: ciclo de quantificação.

Fonte: o autor.

Na conversão para número de cópias de DNA, foi observado que os limites de detecção das reações IS6110, IS1081 e *senX3* foram de 4,7 cópias, 11,8 cópias e 23,6 cópias por reação, respectivamente.

### 5.3.3 Sumário dos resultados do CE-III

Os principais resultados deste capítulo experimental estão apresentados a seguir:

- Entre os protocolos de extração avaliados no CE-III, o que utilizou pérolas de zircônia de 0,1 mm e o equipamento *bead beater* (protocolo B) apresentou os melhores resultados.

- No teste de qPCR *in house* desenvolvido, as concentrações dos iniciadores foram de 400 nM para o par IS6110 e 200 nM para os pares IS1081 e *senX3*. As concentrações das sondas que apresentaram um bom resultado foram 100 nM para as reações IS6110, IS1081 e *senX3* e 200 nM para a reação do controle interno de amplificação (CIA).

- As eficiências dos iniciadores obtidas foram acima de 93% e os limites de detecção da qPCR *in house* foram de 4,7 cópias, 11,8 cópias e 23,6 cópias por reação, respectivamente para os alvos IS6110, IS1081 e *senX3*.

## 6 DISCUSSÃO

A cultura é padrão-ouro para o diagnóstico da TB pulmonar e, embora tenha sensibilidade limitada para amostras extrapulmonares (mas superior à baciloscopia), é o melhor método laboratorial disponível (STEINGART et al., 2014). Outra vantagem é que a maior parte das metodologias faz o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) a partir da cepa crescida na cultura em meio sólido ou líquido. A universalização do TSA, ou seja, a verificação do perfil de sensibilidade em todos os casos de TB é uma meta de praticamente todos os programas nacionais de controle da TB (WHO, 2015).

A tese foi dividida em três capítulos experimentais. O capítulo experimental I (CE-I) foi um estudo descritivo retrospectivo com amostras de rotina recebidas entre maio de 2015 e julho de 2016. Nesse primeiro momento, o objetivo foi fazer uma avaliação preliminar do teste Xpert® MTB/RIF, que tinha sido recém implantado no país, e da baciloscopia com os resultados das amostras disponíveis no sistema de gerenciamento laboratorial.

Como foi observado que os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes eram importantes para o cálculo da sensibilidade e da especificidade clínicas, no capítulo experimental II (CE-II) foi realizado um estudo prospectivo com um controle mais rigoroso dos dados relacionados aos participantes. Foram calculadas a sensibilidade e a especificidade clínicas dos testes diagnósticos, bem como foram feitos dois métodos de genotipagem a partir de DNA genômico disponível nos restos de reação do cartucho Xpert® MTB/RIF.

O capítulo experimental III (CE-III) tratou do desenvolvimento e otimização de uma qPCR para diagnóstico da TB utilizando sondas de hidrólise.

As prevalências entre suspeitas de TB pulmonar e TB extrapulmonar foram de 12,2% e 3,7% no CE-I. No CE-II, entre os casos novos as prevalências foram de 11,4 e 3,5% entre os pacientes sem histórico de TB. Embora no presente estudo tenha sido incluído um número grande de amostras, a prevalência foi baixa. Em uma revisão sistemática e meta-análise de 36 estudos para avaliação do Xpert® MTB/RIF, Steingart e cols (2014) encontraram prevalência de 33,9% entre suspeitos de TB pulmonar utilizando como padrão-ouro a cultura sólida ou cultura a líquida automatizada (STEINGART et al., 2014).

Em outra meta-análise de 14 estudos com amostras extrapulmonares, Denkinger e cols. (2014) encontraram prevalência de

10,9% em amostras de líquido pleural e 22,1% em amostras de líquido cefalorraquidiano utilizando como padrão-ouro a cultura.

Entre as amostras recebidas neste estudo, 24 pulmonares e 4 extrapulmonares no CE-I apresentaram contaminação durante a cultura. A contaminação das culturas reduz a proporção de resultados que podem ser interpretados pelo clínico e acarretam demora no diagnóstico, caso a amostra precise ser repetida (KASSAZA et al., 2014). No Brasil, a faixa do percentual adotado para avaliação da efetividade da descontaminação das amostras pulmonares situa-se entre 3% e 5%. Percentuais menores podem ser decorrentes da concentração elevada do descontaminante, tempo excessivo na descontaminação ou ainda concentração de verde de malaquita elevada no meio de cultura, podendo causar danos inclusive às micobactérias que podem estar presentes na amostra, diminuindo a sensibilidade do método. Por outro lado, percentuais maiores podem significar concentração baixa do descontaminante ou do corante verde de malaquita no meio de cultura, pouco tempo para ação do descontaminante ou algum problema de esterilidade dos reagentes ou do ambiente e assim, atrapalhar no crescimento das micobactérias, diminuindo a sensibilidade da cultura (BRASIL, 2008). Já para amostras extrapulmonares, geralmente estéreis, a contaminação pode indicar coleta ou armazenamento inadequado da amostra ou ainda pode representar o verdadeiro microrganismo responsável pela infecção.

Os índices de contaminação da cultura sólida no CE-I foram de 6,2% e 1,6%. Já no CE-II, os índices de contaminação foram de 2,7% na cultura sólida em amostras pulmonares (não houve contaminação nas amostras extrapulmonares) e 4,4% e 1,2% na cultura líquida nas amostras pulmonares e extrapulmonares, respectivamente. Entre as amostras incluídas na comparação da cultura sólida com a cultura líquida (CE-II), nenhuma apresentou contaminação nos dois meios. Isso pode ter ocorrido porque os meios utilizam inibidores diferentes. O meio Middlebrook 7H9 utiliza a mistura de antibióticos PANTA, enquanto nos meios sólidos a base de ovo o principal inibidor é o verde de malaquita. Além disso, o processo de descontaminação utilizado no método de Ogawa-Kudoh é mais agressivo do que a descontaminação utilizada no método de NALC/NaOH, o que faz com que esse último seja recomendado para amostras paucibacilares (BRASIL, 2008).

Segundo os critérios brasileiros, o percentual de contaminação de amostras pulmonares encontra-se um pouco acima do desejável na cultura sólida no CE-I, um pouco abaixo na cultura sólida no CE-II e dentro da faixa na cultura líquida no CE-II. Porém, os estudos da literatura apontam grande variação nos percentuais de contaminação na

cultura (JASPE et al., 2009; MACIEL et al., 2009; PALACI et al., 2013; TAKAO et al., 2005).

No CE-II, entre as 23 amostras positivas em umas das duas culturas (19 pulmonares e 4 extrapulmonares), 22 (95,7%) foram positivas na cultura sólida (18 pulmonares e 4 extrapulmonares) e 20 (83,3%) na cultura líquida (17 pulmonares e 3 extrapulmonares).

É interessante observar que a única amostra negativa na cultura sólida e positiva na cultura líquida foi negativa na baciloscopia e positiva no teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF. Isso pode ter acontecido porque o meio líquido proporciona melhores condições de crescimento ou, mais provavelmente, que o método de descontaminação (NALC-NaOH) possui melhor eficiência na descontaminação, o que corrobora com os resultados obtidos na padronização da descontaminação pelo NALC-NaOH, onde esse método de descontaminação com sementeira em meio Lowenstein-Jensen foi mais sensível do que o método de Ogawa-Kudoh em amostras com baciloscopia negativa. Por outro lado, as três amostras positivas na cultura sólida e negativas na cultura líquida continham duas ou três cruzes na baciloscopia, o que pode ter ocorrido por problemas na qualidade do meio de cultura, uma vez que tanto a cultura (crescimento duas ou três cruzes) como o teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF foram realizados a partir do sedimento do método NALC-NaOH dessas amostras e todas foram detectadas com resultados *medium* ou *high*.

Ao realizar a cultura líquida no CE-II o objetivo foi compará-la com a cultura sólida em casos de TB. Porém, nas duas amostras que continham MNT também foi possível observar o crescimento das micobactérias nos dois meios de cultura.

A cultura líquida manual foi utilizada com sucesso no estudo de Battaglioli e cols. (2014), quando os autores obtiveram sensibilidade clínica maior do que o método de Ogawa-Kudoh em amostras pulmonares (76%; IC95 69-83% vs 63%; IC95 55-71%). No presente trabalho não foi possível obter a mesma sensibilidade clínica, uma das razões pode ser o fato de que o meio foi preparado em lotes e testado apenas qualitativamente (controles de crescimento e de esterilidade). Assim, um lote do meio de cultura pode ter apresentado problemas não detectados pelo controle de qualidade. Nos meios de cultura comerciais a indústria consegue aplicar um controle de qualidade mais rigoroso, fazendo, por exemplo, a avaliação quantitativa de desempenho do meio de cultura produzido.

Entre os três casos de TB pleural descritos no CE-II, em um deles houve também positividade da cultura de uma amostra de escarro, demonstrando TB concomitante pulmonar e extrapulmonar. A TB

pleural é a forma mais comum de TB extrapulmonar (WONG, 2005). Geralmente a presença do bacilo na cavidade pleural é decorrente de reação hipersensível tardia aos antígenos de *M. tuberculosis* com consequente ruptura do foco caseoso subpleural. Com a ruptura, há uma série de eventos inflamatórios culminando da efusão pleural exsudativa (LIGHT, 2010). Apesar da TB pulmonar e da TB pleural serem considerados eventos independentes, é possível observar por meio da tomografia computadorizada que há acometimento simultâneo em até 40% dos casos (ANTONANGELO et al., 2012).

Além das três amostras de LQP, em uma amostra de aspirado de medula óssea também foi detectado *M. tuberculosis*. Ao contrário do ocorrido nas amostras de LQP, que tiveram a carga bacilar baixa (baciloscopia negativa nas três amostras e Xpert® MTB/RIF positivo somente em uma amostra), a amostras de aspirado de medula óssea apresentou alta carga bacilar, sendo positiva três cruzeiros na baciloscopia e detectado *high* no Xpert® MTB/RIF. A TB disseminada com envolvimento da medula óssea é uma forma incomum de TB, mas exige rápido início do tratamento pois cerca de 50% dos pacientes vão a óbito (HAKAWI; ALRAJHI, 2006).

A maior parte dos participantes deste estudo foi formada por pessoas idosas. Ao contrário do que acontece com a pneumonia por exemplo, que entre os adultos atinge os mais idosos (SMILJIC et al., 2017). No entanto, os casos de TB deste estudo ficaram distribuídos em todas as idades de maneira muito parecida, englobando muitos pacientes na faixa etária entre 20 e 50 anos. Essa situação tem impactos sociais e econômicos fortes, uma vez que essa faixa representa o núcleo da idade produtiva e geralmente é necessário o afastamento temporário das atividades laborais por causa da debilidade física e mental do paciente e do risco de transmissão da doença (DONALD; MARAIS; BARRY-III, 2010). Em pacientes com TB-MDR as consequências podem ser ainda mais severas (MORRIS et al., 2014).

A tosse prolongada (mais de duas semanas) é o principal sintoma da TB, sendo inclusive indicada como importante sinal de alerta pela grande maioria das campanhas públicas para detecção dos casos (FIELD et al., 2018). No CE-II foi possível observar que o percentual de pacientes com tosse era maior nos participantes com TB, o que corrobora com a literatura (TURNER et al., 2014). Outros sintomas clássicos da TB incluem a perda de peso, sudorese noturna e febre baixa (ALCÂNTARA et al., 2012). Com exceção da febre, todos os outros sintomas foram estatisticamente mais prevalentes em pacientes incluídos no CE-II com cultura positiva para TB.

Outra característica que foi significativamente mais prevalente foi o contato prévio com outra pessoa com TB. A transmissão da TB ocorre por meio de aerossóis expelidos pela fala, espirro, canto e principalmente tosse dos pacientes bacilíferos, com risco ampliado no caso de contato íntimo e prolongado com paciente bacilífero (GUPTA et al., 2012). Assim, o contato prévio com pessoas com TB, como por exemplo dentro da moradia ou em locais que abrigam pessoas privadas de liberdade, é um fator de risco para infecção por *M. tuberculosis* (MEDEIROS et al., 2018; MORRISON; PAI; HOPEWELL, 2008).

Nas amostras pulmonares, a baciloscopia apresentou moderada sensibilidade (no CE-I foi de 67,4%; IC95 51,5-80,9% e no CE-II foi de 80,0%; IC95 51,9-95,7% nas amostras de pessoas sem histórico de TB), o que já era esperado, pois dificilmente a sensibilidade do método ultrapassa 80% em adultos. Em crianças, a sensibilidade é ainda menor (KUNKEL et al., 2016). A sensibilidade clínica da baciloscopia no CE-I, pode ter sido subestimada, uma vez que frequentemente a segunda amostra pulmonar do mesmo paciente recebe numeração diferente da primeira amostra quando é registrada no sistema de gerenciamento laboratorial (LACL/HU/UFSC). A baciloscopia da segunda amostra pode aumentar a detecção de bacilos em mais de 10% dos casos de TB pulmonar (MASE et al., 2007). No CE-II as amostras do mesmo paciente e do mesmo tipo de material (como por exemplo duas amostras de escarro) foram agrupadas e, portanto, consideradas uma amostra só na tentativa de contornar a subestimação da sensibilidade da baciloscopia. Por outro lado, até 50% dos pacientes não voltam para coletar a segunda amostra (SQUIRE et al., 2005).

A especificidade clínica da baciloscopia em amostras pulmonares foi alta, o que também está de acordo com os resultados encontrados na literatura. No CE-I, uma amostra de aspirado brônquico, positiva na baciloscopia e positiva na cultura para *M. xenopii*, foi considerada falso positivo na baciloscopia para *M. tuberculosis*, uma vez que pode conduzir a um tratamento incorreto do paciente. Embora o tratamento de infecções por *M. xenopii* não esteja bem estabelecido, normalmente são utilizados um macrolídeo, rifampicina, etambutol e moxifloxacino (BROWN-ELLIOTT; NASH; WALLACE, 2012). A espécie *M. xenopii* atinge principalmente os pulmões e, ocasionalmente, pode acometer outros sítios como linfonodos, espaço articular ou ainda causar infecção disseminada (WILDNER et al., 2011).

Além do caso de MNT por *M. xenopii* no CE-I, no CE-II ocorreram dois casos de MNT com baciloscopia positiva em amostras pulmonares, sendo uma com crescimento de *M. bohemicum* e a outra de

*M. abscessus*. Na rotina, os laboratórios que possuem o teste Xpert® MTB/RIF podem optar pela sua utilização em diferentes esquemas, mas geralmente são adotados os seguintes protocolos: 1) um teste de primeira linha, sendo utilizado para processar todas as amostras independente do resultado da baciloscopia; 2) um teste adicional, somente para amostras negativas na baciloscopia (esquema que deve ser utilizado somente em países com alta prevalência de TB) ou 3) um teste adicional somente nas amostras positivas na baciloscopia para diferenciação entre TB e outras micobacterioses (esquema que só deve ser utilizado em países com baixa prevalência de TB).

Como a baciloscopia detecta bacilos álcool-ácido resistentes, ela não é específica para *M. tuberculosis*, fazendo com que o Xpert® MTB/RIF sirva como um auxiliar na diferenciação entre TB e infecção por MNT (ARDIZZONI et al., 2015; DYLEWSKI, 2009). Na amostra do CE-I em que *M. xenopii* foi detectado na baciloscopia, por exemplo, o resultado do Xpert® MTB/RIF foi não detectado e, assim, o esquema 1 (que foi utilizado em nosso estudo), auxiliou nessa diferenciação. Outra aplicação foi na amostra da paciente com crescimento de bactéria do complexo *M. abscessus*. Essa amostra é originária de paciente com histórico de infecção por *M. tuberculosis* e por *M. abscessus*, neste caso se houvesse infecção por *M. tuberculosis* o teste Xpert® MTB/RIF seria positivo, uma vez que em amostras que contêm alta carga bacilar (essa foi positiva com três cruces na baciloscopia) a sensibilidade e a especificidade do teste Xpert® MTB/RIF são próximas a 100%.

Já a amostra com crescimento de *M. bohemicum* foi obtida de um participante que vive com o HIV, a baciloscopia da amostra continha apenas 1 BAAR em 100 campos observados e o teste Xpert® MTB/RIF apresentou resultado não detectado. Os relatos das infecções por *M. bohemicum* são raros, mas alguns estudos relacionam a bactéria principalmente como um agente de linfadenite cervical pediátrica (HUBER et al., 2008; TORTOLI et al., 2018).

No CE-II também houve a detecção de um participante com duas cruces na baciloscopia e resultado detectado no teste Xpert® MTB/RIF. Além dos casos de MNT, as outras possíveis causas de baciloscopia positiva com cultura negativa são os erros de laboratório, presença de micobactéria não cultivável, bactéria de outros gêneros com álcool-ácido resistência (como *Rhodococcus*, *Nocardia* e *Actinomyces*) ou ainda algum artefato falso positivo (LEE et al., 2008; SUBHASH et al., 2001).

No CE-I, a sensibilidade do Xpert® MTB/RIF foi alta nas amostras pulmonares com baciloscopias positiva (96,6%; IC95 82,2-



99,9%) e negativa (92,9%; IC95 66,1-99,8%). No CE-II, a sensibilidade foi de 100,0% (IC95 78,2-100,0) nas amostras pulmonares, tanto nas amostras com baciloscopia positiva quanto nas amostras com baciloscopia negativa. Em uma recente meta-análise de 25 estudos com amostras pulmonares com baciloscopia negativa, Yan, Xiao e Zhang (2016) encontraram sensibilidade e especificidade agrupadas para o teste Xpert® MTB/RIF de 59% (IC 95% 0,51-0,67) e 98% (IC 95% 0,97-0,99), respectivamente.

Por outro lado, nas amostras com baciloscopia negativa que foram incluídas no CE-I a especificidade do Xpert® MTB/RIF foi de 96,5% (IC95 93,7-98,2%), menor do que a especificidade do Xpert® MTB/RIF nas amostras positivas na baciloscopia e do que a baciloscopia em si. No CE-II a especificidade clínica do teste Xpert® MTB/RIF em amostras pulmonares de participantes sem histórico de TB foi parecida (96,9%; IC95 92,3-99,2%). Uma revisão sistemática publicada por Steingart e cols. (2014) demonstrou resultados de 100% de especificidade para amostras com baciloscopia positiva e 94% para baciloscopia negativa. Outra revisão sistemática, com 18 estudos e 10224 amostras, demonstrou especificidade igual para amostras com baciloscopia positiva e negativa (CHANG et al., 2012). No CE-I, entre os resultados positivos no Xpert® MTB/RIF, 13 eram verdadeiro-positivos e 11 falso-positivos entre as amostras pulmonares e três eram verdadeiro-positivos e três falso-positivos entre as amostras extrapulmonares. Isso pode ter ocorrido porque testes moleculares detectam bacilos de *M. tuberculosis* viáveis e não viáveis (BOYLES et al., 2014). Embora o teste filtre a amostra para que os restos de DNA sejam lavados e dispensados e somente os bacilos intactos permaneçam no teste, na prática isso não ocorre e até mesmo bacilos não intactos são detectados no teste Xpert® MTB/RIF (METCALFE et al., 2015; THERON et al., 2016). Apesar de ser mais comum entre os pacientes com TB prévia, há também casos de resultados falso-positivos entre pacientes nunca antes diagnosticados com TB (THERON et al., 2016). No CE-II, mesmo nas amostras de pacientes sem histórico de TB prévia, foram encontrados quatro resultados falso-positivos. Porém, enquanto nas amostras pulmonares de participantes sem histórico de TB prévia a especificidade foi de 96,9% (IC95 92,3-99,2%), em amostras de participantes com TB prévia ela foi um pouco menor (82,8% (IC95 64,2-94,2%). Há também a possibilidade de o teste molecular ser mais sensível do que a cultura, especialmente em amostras extrapulmonares, onde a cultura consegue detectar a TB somente em até 80% dos casos (LEE, 2015).

Em pacientes com TB prévia, os resultados do CE-II demonstraram que a baciloscopia forneceu uma especificidade maior (93,1%; IC95 77,2-99,2%) em relação ao teste Xpert® MTB/RIF (82,8%; IC95 64,2-94,2%). Friedrich e cols. (2013), em um estudo para avaliar a utilidade do teste Xpert® MTB/RIF no acompanhamento do tratamento da TB, observaram que o teste molecular leva mais tempo para apresentar um resultado negativo após início do tratamento em comparação à baciloscopia e à cultura. Assim, por mais que a terapia esteja sendo eficaz, o bacilo inviável permanece por mais tempo e, consequentemente, fornece um resultado falso positivo. Há relatos de pacientes com outras doenças pulmonares que, depois de até 5 anos de cura da TB, tiveram resultado detectado no teste Xpert® MTB/RIF (BOYLES et al., 2014).

Na estratificação dos resultados fornecidos pelo Xpert® MTB/RIF no CE-I, 10 das 11 amostras pulmonares com resultado falso-positivo foram amplificadas apenas acima de 29 ciclos (resultado *very low*). Os resultados do CE-II foram parecidos, três das quatro amostras pulmonares de pacientes sem histórico de TB prévia e quatro das cinco amostras pulmonares de pacientes com TB prévia amplificaram com resultado *very low*. Com exceção de uma amostra pulmonar no CE-II, que amplificou com resultado *medium*, as demais amostras amplificaram entre os ciclos 23 e 28 (resultado *low*). Assim, é possível observar que os resultados falso-positivos geralmente são amplificados nos últimos ciclos. Para os resultados *very low*, o VPP no CE-I foi de apenas 29%, ou seja, em 71% dessas amostras os resultados foram falso-positivos.

Nas amostras extrapulmonares, a especificidade do Xpert® MTB/RIF foi alta (98,5%; IC95 95,8-99,7% no CE-I e 98,8%; IC95 93,5-100,0 no CE-II). Apesar do baixo número de amostras, com consequente intervalo de confiança bem abrangente, a sensibilidade foi baixa (37,5%; IC95 8,5-75,5% no CE-I e 50,0%; IC95 6,8-93,2%). Mesmo analisando os dados de forma conjunta (amostras extrapulmonares do CE-I e do CE-II), a sensibilidade ficaria em 41,7% (IC95 15,2-72,3%). Sehgal e cols. (2016), em uma meta-análise com 2486 amostras de líquido pleural, de 24 estudos utilizando a cultura como padrão-ouro, encontraram sensibilidade e especificidade agrupadas de 51% (IC95 43-60%) e 99% (IC95 97-100%), respectivamente.

Em outra meta-análise, Maynard-Smith e cols. (2014) encontraram sensibilidade e especificidade agrupadas do teste Xpert® MTB/RIF nas amostras de líquido pleural de 34% (IC95 24-44%) e 98% (IC95 96-99%), respectivamente. Na meta-análise das amostras de

tecidos em geral a sensibilidade foi de 88% (IC95 77-95%) e a especificidade de 98% (IC95 87-99%). Para LCR, devido ao baixo número de amostras, os autores não conseguiram calcular sensibilidade e especificidade agrupadas, mas as medianas foram de 85% e 100%, respectivamente (MAYNARD-SMITH et al., 2014).

Em relação aos falso-positivos no teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF, um possível problema é a especificidade analítica do teste. Ainda que o material genético de praticamente todas as bactérias que podem estar presentes no trato respiratório superior não tenha homologia com o gene *rpoB* de *M. tuberculosis*, algumas poucas bactérias, como por exemplo *M. scrofulaceum* e *Nocardia asteroides* em elevadas concentrações podem apresentar resultado falso-positivo (BLAKEMORE et al., 2010; FDA, 2013).

O percentual de resistência no CE-I foi de 2,3%, uma vez que entre as 44 amostras positivas na cultura e com TSA, apenas uma amostra era MDR. No CE-II esse valor aumentou para 12,5%, pois duas amostras eram MDR em 16 amostras com cultura positiva e resultado do TSA disponível. Um dos pacientes tinha histórico de TB prévia (dois episódios anteriores com abandono de tratamento), o outro paciente não tinha histórico de TB. As taxas de TB-MDR no Brasil são de 1,5% nos casos novos ou recidivas (novo diagnóstico após tratamento anterior completo ou cura declarada) e de 8,0% nos casos previamente tratados (tratamento incompleto ou abandono de tratamento) (WHO, 2016).

Entre todas as amostras positivas no Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF, apenas quatro foram positivas na detecção da resistência à rifampicina, sendo uma verdadeiro-positiva e outra falso-positiva no CE-I e duas verdadeiro-positivas no CE-II. A sensibilidade foi de 100% no CE-I e no CE-II, mas o intervalo de confiança foi extremamente amplo, pois o número de amostras foi muito pequeno para que o teste tenha poder estatístico forte.

Os problemas mais comuns em resultados falso-positivos na detecção da resistência envolvem amostras com baixa carga bacilar (amplificações *very low*, acima de 29 Ct) que, devido à instabilidade das sondas D e E, levam a um Cq elevado (OCHERETINA et al., 2016). Porém, na amostra do CE-I em que foi detectado o resultado falso-positivo (resistência à rifampicina) em nosso estudo, a sonda D, que abrange os códons 522 a 528 do gene *rpoB*, não amplificou nem mesmo nos ciclos finais. Mutações silenciosas (que trocam um aminoácido mas não resultam na troca da proteína traduzida) na região determinante de resistência à rifampicina (RRDR – *Rifampicin Resistance Determining Region*), como por exemplo a L533L, também podem causar resultados

falso positivos no teste Xpert® MTB/RIF (MATHYS et al., 2014). Por fim, caso haja populações mistas, na amostra, a mutação pode ser detectada no Xpert® MTB/RIF, mas não no teste de sensibilidade fenotípico, uma vez que bactérias resistentes à rifampicina podem ter um custo biológico associado, apresentando crescimento mais lento quando comparadas às bactérias sensíveis (GAGNEUX et al., 2015; OCHERETINA et al., 2016).

Para correção dos problemas relacionados à especificidade na detecção de resistência à rifampicina, a próxima geração do cartucho que está em fase de testes (Xpert® MTB/RIF Ultra) utiliza a tecnologia de temperatura de *melting* de alta resolução (AEL, 2016).

Embora os problemas de falso-positivos na detecção da resistência, duas das principais vantagens do teste Xpert® MTB/RIF são a rapidez na liberação do resultado e a possibilidade de liberação de um resultado não inconclusivo, visto que tanto no CE-I como no CE-II houve casos de contaminação de cultura e falta de meio de cultura para realização do teste fenotípico, com consequente falta de liberação do resultado ao paciente.

A genotipagem de isolados de *M. tuberculosis* pode auxiliar no estudo da epidemiologia clássica da TB. Entre os principais utilidades destacam-se aprimorar informações a respeito da dinâmica de transmissão, auxiliar na diferenciação entre recidiva ou reinfecção, auxiliar na investigação e confirmação de surtos e/ou contaminação cruzada laboratorial e identificar os clones de maior ocorrência, inclusive os clones de TB-MDR para a tomada de decisões clínicas e de vigilância epidemiológica (BARNES; CAVE, 2003; TESSEMA et al., 2013).

Os principais métodos de genotipagem de isolados de *M. tuberculosis* são o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição) da sequência de inserção IS6110 (RFLP-IS6110), que utiliza a enzima de restrição *PvuII* e sondas que hibridizam na IS6110 (VAN SOOLINGEN et al., 1994), o *spoligotyping*, cujo fundamento é o perfil de presença ou ausência de 43 espaçadores não conservados presentes entre sequências DR conservadas de bactérias do complexo *M. tuberculosis* (KAMERBEEK et al., 1997) e o MIRU, que caracteriza os isolados por meio do número de repetições de 12, 15 ou 24 regiões de unidades repetição (SUPPLY et al., 2000).

O RFLP-IS6110 foi considerado por muito tempo o padrão-ouro da genotipagem de *M. tuberculosis* pois possui um alto poder discriminatório, mas não possui a etapa de amplificação do DNA e, por

isso, precisa partir de uma grande quantidade de DNA, que é obtida somente após a cultura do isolado clínico (KATO-MAEDA; METCALFE; FLORES, 2015). Além disso, ele tem baixa resolução em bactérias que possuem cinco cópias ou menos da IS6110 (EI et al., 2016). O *spoligotyping* possui menor poder discriminatório do que o RFLP-IS6110, mas alguns estudos sugerem que a utilização conjunta do *spoligotyping* e MIRU-15 pode alcançar um alto poder discriminatório em estudos epidemiológicos (JAGIELSKI et al., 2014; SUPPLY et al., 2006).

No protocolo do teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF, a amostra clínica é pipetada em um tubo, adiciona-se o reagente da amostra SR (*sample reagent*) e, após agitada em vórtex e repousada por 15 minutos, a mistura é inserida no cartucho que será inserido no equipamento. Alame-Emane e cols. (2017) fizeram testes com métodos genotípicos a partir dos restos da mistura do SR com a amostra clínica. Porém, foi necessária uma etapa de extração do DNA antes da sua utilização nas PCRs, o que torna o método mais trabalhoso, e nem sempre sobra o volume necessário para fazer a extração do DNA (VENTER et al., 2017).

Por causa das desvantagens apresentadas no parágrafo anterior, Venter e cols. (2017) fizeram *spoligotyping* e detecção de resistência por testes comerciais genotípicos (*MTBDRplus* e *MTBDRsl*) e obtiveram sucesso com restos de reação de amostras que amplificaram em 24 ciclos ou menos do Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF. Esse foi o único estudo encontrado que utilizou restos de reação do teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF como fonte de DNA de *M. tuberculosis*.

No CE-II, não foi possível obter sucesso no *spoligotyping* a partir dos restos de reação do teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF. Por outro lado, com exceção de alguns *loci* em poucas amostras, o MIRU-15 apresentou resultados satisfatórios com os restos de reação de amostras clínicas que amplificaram em 21 ciclos ou menos no teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF. Como o poder discriminatório da maioria dos *loci* foi alto e a maior parte das amostras apresentou perfis únicos, a rápida realização do MIRU-15 pode auxiliar principalmente no esclarecimento entre um caso de recidiva ou reinfeção, especialmente em pessoas que vivem com o HIV, nos quais a chance de reinfeção é alta (CRAMPIN et al., 2010; LAMBERT et al., 2003; WITNEY et al., 2017).

Com os restos de reação das amostras clínicas que amplificaram acima de 24 ciclos no teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF, apenas uma amostra amplificou quatro *loci*. Nessas amostras a concentração de DNA genômico nos restos de reação é baixa e a PCR quantitativa com

detecção por *molecular beacon*, utilizada no teste Xpert® MTB/RIF, é mais sensível do que a PCR de ponto final. Portanto, era esperado que as amostras que amplificaram em ciclos maiores no Xpert® MTB/RIF não amplificariam no MIRU-15. Nessas amostras, só foi possível obter os perfis de MIRU-15 a partir do DNA extraído do isolado clínico.

Foram realizadas as técnicas de genotipagem em 26 amostras, sendo 19 de amostras pulmonares e 4 extrapulmonares incluídas no CE-II e 3 amostras de pacientes que fizeram os testes para acompanhamento do tratamento.

As variações do MIRU comumente empregadas em estudos de tipagem molecular utilizam 12-*loci*, 15-*loci* ou 24-*loci* (RASOAHANITRALISOA et al., 2017). O MIRU-24 (24-*loci*) é o que possui o maior poder discriminatório, porém a realização do método de forma manual (com revelação em gel de agarose) torna-o extremamente laborioso e, portanto, normalmente essa configuração é adotada quando há disponibilidade de determinação do tamanho do produto amplificado por eletroforese capilar em sequenciadores automáticos (BEER et al., 2012). Assim, as configurações utilizando 12 e 15 loci são boas alternativas para a rápida tipagem. Apesar de ser um pouco mais trabalhoso (por possuir 3 *loci* a mais para amplificar), o MIRU-15 possui um poder discriminatório maior do que o MIRU-12 e próximo ao do MIRU-24 (PAN et al., 2017; SILVA et al., 2014). Além disso, assim como obtido neste estudo, em geral o poder discriminatório do MIRU-15 é superior ao do *spoligotyping* (CÁCERES et al., 2014; LU et al., 2014).

No *spoligotyping* as famílias mais prevalentes foram a LAM (6/26; 23,1%), seguida por T (5/26; 19,2%) e Haarlem (4/26; 15,4%). Esses dados corroboram o que se encontra no estado de SC, visto que as três famílias foram também as mais prevalentes (LAM: 47,5%; T: 25,9% e Haarlem: 12,3%) em um estudo de Nogueira e cols. com 406 isolados clínicos provenientes de várias partes de SC (NOGUEIRA et al., 2016). Em outro estudo com 219 isolados clínicos da Grande Florianópolis foram encontradas as prevalências de 62,1% da família LAM, 20,5% da família T e 9,6% da família Haarlem (SCHEFFER, 2017). Em outros estudos do Brasil essas três famílias também são as mais encontradas (CONCEIÇÃO et al., 2017; DANTAS et al., 2015; VASCONCELLOS et al., 2014; VINHAS et al., 2013).

O SIT 106, encontrado em um dos dois isolados MDR, já foi descrito em dois outros estudos que utilizaram isolados clínicos de SC, sempre em isolados clínicos MDR. Em um dos estudos, realizado com bactérias isoladas de 2008 a 2012, esse SIT foi o mais prevalente, com

26,4% de um total de 53 isolados clínicos MDR (NOGUEIRA et al., 2016; PRIM et al., 2015). Portanto, os resultados do CE-II demonstram que, apesar do baixo número de amostras, esse SIT continua circulando em SC podendo causar infecções de TB-MDR mesmo em pacientes nunca tratados para TB.

Os testes comerciais para detecção de TB geralmente possuem um custo alto, especialmente em comparação aos testes *in house* (PIERSIMONI; SCARPARO, 2003). O custo para aquisição dos cartuchos Xpert® MTB/RIF para países em desenvolvimento prioritários no controle da TB, que inclui o Brasil, é de US\$ 9,98 (ALBERT et al., 2016). Porém, de 2014 a 2017 o custo da implantação no país (aquisição de máquinas GeneXpert) e utilização do teste (cartuchos) foi de 167,41 reais por caso notificado. Para fins de comparação, a baciloscopia teve um custo de 100,25 reais por caso notificado (PINTO et al., 2017).

Além disso, em 2016 houve atraso na aquisição de novos cartuchos, o que levou ao desabastecimento dos laboratórios da rede de TRM-TB no Brasil por aproximadamente quatro meses. Diante desses motivos, buscou-se desenvolver um teste molecular *in house* para detecção de *M. tuberculosis* em amostras clínicas.

Na etapa de padronização da extração, foi utilizada uma suspensão de *M. tuberculosis* para comparação dos protocolos. Foram encontrados diferentes valores para a relação entre a quantidade de bactérias e a turvação do tubo 1,0 da escala de McFarland nas publicações, variando de  $1,97 \times 10^6$  UFC/mL a  $3 \times 10^8$  UFC/mL (BOLLELA; SATO; FONSECA, 1999; PEÑUELAS-URQUIDES et al., 2013). Assim, optou-se por determinar no laboratório a relação entre os dois valores e obteve-se o valor de  $4,7 \times 10^7$  UFC/mL.

Em países com baixa incidência de TB os testes moleculares são indicados para amostras positivas na baciloscopia, ou seja, para a confirmação da TB pois geralmente as MNT possuem maior incidência nesses países. Por outro lado, em países de alta incidência da doença como no Brasil, um método molecular deve possuir sensibilidade suficiente para detectar amostras que não são detectadas pela baciloscopia (DYLEWSKI, 2009). A diluição da suspensão utilizada para testar a extração de DNA foi escolhida dessa forma porque o limite de detecção da baciloscopia é entre 5.000 e 10.000 bacilos/mL e a contagem de bactérias da suspensão escolhida ficou com valor de 2.430 UFC/mL. Além disso, a diluição da suspensão utilizada apresentou resultado *low* no Xpert® MTB/RIF e, no CE-I do presente estudo, foi possível observar que apenas 35% das amostras que apresentaram esse

resultado no Xpert® MTB/RIF (detectado *low*) foram detectadas também pela baciloscopia.

Desde que foram descobertas, as sequências de inserção sempre tiveram notoriedade e grande potencial de utilização como alvos para diagnóstico da TB. O genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, primeira cepa a ser completamente sequenciada, possui 34 sequências de inserção, sendo a IS6110 (16 cópias) e a IS1081 (6 cópias) os elementos que estão presentes em maior número (COLE et al., 1998). No desenvolvimento da qPCR para detecção de *M. tuberculosis* foram escolhidos três diferentes alvos. Primeiramente, optou-se por selecionar a IS6110 pois ela pode estar presente entre zero e 25 cópias ao longo do genoma do bactérias do CMTB (MCEVOY et al., 2007). No Brasil, geralmente os isolados de *M. tuberculosis* contêm um elevado número de cópias da IS6110, mas cerca de 5% das cepas possuem menos de 6 cópias da IS6110 no genoma (AUGUSTO et al., 2017; CAFRUNE et al., 2006; FERRAZOLI et al., 2000), o que diminui a sensibilidade desse alvo para a detecção dessas cepas. Além disso, a IS6110 possui homologia com outras espécies de micobactérias e até mesmo bactérias de outros gêneros, especialmente as presentes em amostras provenientes do trato respiratório superior, o que pode induzir a resultados falso-positivos e, conseqüentemente, diminuir a especificidade clínica (SANJUAN-JIMENEZ et al., 2015).

O segundo alvo utilizado, a IS1081, está presente no genoma com cinco a sete cópias. Ao contrário da IS6110, a IS1081 é um elemento mais estável e não foram encontradas na literatura cepas com menos de cinco cópias, o que torna o alvo interessante para detecção de *M. tuberculosis* em amostras clínicas (BOYLE et al., 2014; COLLINS; STEPHENS, 1991).

Alguns testes comerciais exploram as sequências de inserção para diagnóstico da TB. O teste Xpert® MTB/RIF utilizado atualmente detecta apenas o gene *rpoB*, mas a nova geração do teste, denominado de Xpert® MTB/RIF Ultra fará a detecção de três alvos, sendo a IS6110 e a IS1081 os dois novos alvos (o gene *rpoB* será mantido para detecção da resistência à rifampicina), o que reforça a importância das duas sequências de inserção no diagnóstico da TB (JONES et al., 2016).

Optou-se por adicionar um terceiro alvo, o gene *senX3*, que faz parte do sistema regulatório de dois componentes *senX3-regX3* e vem sendo utilizado com sucesso na detecção da TB (SANJUAN-JIMENEZ et al., 2015). Além disso, ele é necessário para a virulência da bactéria e, portanto, sempre deve estar presente em *M. tuberculosis* (PARISH et al., 2003).



O quarto alvo da qPCR *in house* desenvolvida nesse estudo é o oligonucleotídeo sintético C+CtPC, que é adicionado nas reações IS6110-CIA e utilizado como controle interno de amplificação (CIA) para detecção de inibidores de PCR que podem estar presentes na amostra clínica. Optou-se por trabalhar com um CIA do tipo competitivo, ou seja, que é amplificado com o mesmo par de iniciadores do DNA alvo, sob as mesmas condições e no mesmo tubo. Nesse tipo de controle há competição entre o DNA de *M. tuberculosis* e o CIA e, portanto, a concentração do oligonucleotídeo sintético é o fator mais importante para que o limite de detecção da reação do DNA alvo (IS6110) não seja prejudicado (HOORFAR et al., 2004).

Para o CIA poderiam ser utilizadas diversas sequências sintéticas, porém optou-se por utilizar uma região do plasmídeo críptico de *C. trachomatis* porque o laboratório já acumula experiência em PCR para detecção desse alvo (GOLFETTO, 2014). Flores e cols. (2009) também utilizaram um CIA de *C. trachomatis* em uma reação para detecção de *M. tuberculosis*, porém com tamanho do produto amplificado de 163 pb, menor do que o utilizado em nosso estudo.

A variação na energia livre de Gibbs, simbolizada por  $\Delta G$ , é utilizada para quantificar a espontaneidade da formação de estruturas secundárias. Em uma interação entre oligonucleotídeos podem ser formados dímeros (interação entre duas moléculas do mesmo ou de diferentes oligonucleotídeos) ou *hairpins* (estrutura em *loop* de uma só molécula) (ABD-ELSALAM, 2003). Quanto menor o valor de  $\Delta G$  (ou quanto mais negativo), maior a quantidade de energia necessária para separar a dupla fita de DNA da estrutura secundária e, por consequência, mais estável é a ligação. Com isso a disponibilidade dos iniciadores é menor e a eficiência da PCR pode ser prejudicada ou, ainda, podem ser amplificados produtos inespecíficos (BRESLAUER et al., 1986).

É muito comum a avaliação da eficiência dos iniciadores em qPCR quando o objetivo é a quantificação da expressão de genes. Em ensaios qualitativos, como na detecção de bactérias, a eficiência da PCR está diretamente relacionada com a sensibilidade analítica do método e, portanto, esse é um importante parâmetro de desenvolvimento da qPCR.

O valor mínimo de  $\Delta G$  de estruturas secundárias dos oligonucleotídeos utilizados neste estudo foi de -5,12 (na reação IS1081-*senX3*), valor satisfatório por se tratar de uma PCR *multiplex*. Na literatura há dezenas de estudos com diversos pares de iniciadores para o diagnóstico da TB. Porém, optou-se por desenhar os iniciadores utilizados no estudo, pois em uma análise prévia (resultados não demonstrados) os valores de  $\Delta G$  apresentaram-se muito baixos.

Na qPCR *in house* desenvolvida neste estudo a sensibilidade clínica foi maior no alvo IS6110 (22,5 fg/4,7 cópias por reação), seguida pelo alvo IS1081 (56,3 fg/11,8 cópias por reação) e, por fim, o gene *senX3* (112,5 fg/23,6 cópias por reação). Esse resultado era esperado porque as eficiências dos iniciadores foram próximas de 100% e, conforme relatado anteriormente, a cepa utilizada para a etapa de otimização (*M. tuberculosis* H37Rv) possui dezesseis cópias da IS6110, seis cópias da IS1081 e apenas uma cópia do gene *senX3*. Santos e cols. (2018) desenvolveram uma qPCR com a IS6110 como alvo e encontraram um limite de detecção de 15 fg, próximo ao encontrado neste estudo.

Se o estudo prospectivo com mais amostras clínicas mostrar o mesmo desempenho da padronização sugere-se que a PCR *in house* padronizada neste estudo seja incorporada à rotina do HU.

## 7 CONCLUSÕES

Como conclusões finais do trabalho, pode-se afirmar que:

- A sensibilidade da baciloscopia em amostras pulmonares variou entre 67,4 e 80% e a especificidade foi acima de 99%, tanto no CE-I como no CE-II;

- A sensibilidade do teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF em amostras pulmonares foi acima de 92% nas amostras com baciloscopia positiva ou negativa. A especificidade foi acima de 96% no CE-I e nas amostras de participantes sem histórico prévio de TB no CE-II;

- Nas amostras dos pacientes previamente tratados para TB, a baciloscopia apresentou uma especificidade maior do que o teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF (93,1% versus 82,8%).

- A cultura em meio sólido detectou um maior número de casos de TB em relação à cultura em meio líquido;

- Os sintomas de tosse por mais de duas semanas, sudorese noturna e perda de peso, bem como o contato anterior com pacientes com TB estavam presentes em percentuais maiores nos participantes com cultura positiva do que nos demais participantes;

- É possível a aplicação do MIRU-15 a partir dos restos de reação do teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF quando esse apresenta a média dos ciclos de quantificação abaixo ou igual a 21;

- A qPCR desenvolvida e otimizada apresentou um bom potencial para ser utilizada em amostras clínicas.

Por fim, como perspectiva está a realização da extração e da qPCR desenvolvida e otimizada no CE-III a partir das amostras congeladas em freezer -80°C dos participantes do CE-II. Assim, espera-se poder avaliar o desempenho da qPCR *in house* em amostras clínicas.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ELSALAM, K. A. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. **African Journal of Microbiology Research**, v. 2, n. 5, p. 91–95, 2003.
- AEL, W. VAN. **Xpert MTB / RIF Ultra**, 2016.
- ALAME-EMANE, A. K. et al. The use of GeneXpert remnants for drug resistance profiling and molecular epidemiology of tuberculosis in Libreville, Gabon. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 2105–2115, 2017.
- ALBERT, H. et al. Development, roll-out and impact of Xpert MTB/RIF for tuberculosis: What lessons have we learnt and how can we do better? **European Respiratory Journal**, v. 48, n. 2, p. 516–525, 2016.
- ALCÂNTARA, C. C. S. et al. Factors associated with pulmonary tuberculosis among patients seeking medical attention at referral clinics for tuberculosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, n. 5, p. 622–629, 2012.
- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell**, v. 128, p. 1037–1050, 2007.
- ALLAND, D. et al. **Xpert MTB/RIF Ultra: A New Near-Patient TB Test With Sensitivity Equal to Culture**. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. **Anais...2015**
- AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, n. 134, p. 1–7, 2010.
- AMLEROVA, J.; BITAR, I.; HRABAK, J. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using whole genome sequencing. **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 5, p. 537–545, 2018.
- ANTONANGELO, L. et al. Pleural tuberculosis: is radiological evidence of pulmonary-associated disease related to the exacerbation of the inflammatory response? **Clinics**, v. 67, n. 11, p. 1259–1263, 2012.
- ARDIZZONI, E. et al. Implementing the Xpert1MTB/RIF diagnostic test for tuberculosis and rifampicin resistance: Outcomes and lessons learned in 18 countries. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144656, 2015.
- ARVAND, M. et al. Primary isolation of *Mycobacterium tuberculosis* on blood agar during the diagnostic process for cat scratch disease. **Infection**, v. 26, n. 4, p. 254, 1998.
- AUGUSTO, C. J. et al. Comparative study of RFLP-IS6110 and MIRU-VNTR from *Mycobacterium tuberculosis* isolated in the state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 641–646, 2017.
- BANADA, P. P. et al. Containment of bioaerosol infection risk by the Xpert MTB/RIF assay and its applicability to point-of-care settings. **Journal of**

- Clinical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3551–3557, 2010.
- BARNES, P. F.; CAVE, M. D. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 1149–1156, 2003.
- BARRERA, L. The Basics of Clinical Bacteriology. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. (Eds.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. São Paulo, Buenos Aires: [s.n.].
- BARRY III, C. E. et al. Mycolic acids: Structure, biosynthesis and physiological functions. **Progress in Lipid Research**, v. 37, n. 2–3, p. 143–179, 1998.
- BATTAGLIOLI, T. et al. Manual liquid culture on simple Middlebrook 7H9 or MGIT for the diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. **Tropical medicine & international health**, v. 19, n. 12, p. 1500–1503, 2014.
- BEER, J. L. DE et al. First Worldwide Proficiency Study on Variable-Number Tandem-Repeat Typing of Mycobacterium tuberculosis Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 662–669, 2012.
- BERTOLLI FILHO, C. **História social da tuberculose e do tuberculoso: 1900-1950**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2001.
- BEZANÇON, F.; GRIFFON, V. Culture du bacille tuberculeux sur le “jaune d’oeuf gélosé”. **C. R. Soc. Biol.**, v. 55, p. 603–604, 1903.
- BISHOP, P. J.; NEUMANN, G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. **Tubercle**, v. 51, n. 2, p. 196–206, 1970.
- BLAKEMORE, R. et al. Evaluation of the Analytical Performance of the Xpert MTB/RIF Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 2495–2501, 2010.
- BOHEME, C. C. et al. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 11, p. 1005–1015, 2010.
- BOLLELA, V. R.; SATO, D. N.; FONSECA, B. A. L. McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using Mycobacterium tuberculosis as a research tool. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 9, p. 1073–1076, 1999.
- BOYLE, D. S. et al. Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis by Recombinase Polymerase Amplification. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–9, 2014.
- BOYLES, T. H. et al. False-positive Xpert MTB/RIF assays in previously treated patients: Need for caution in interpreting results. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 18, n. 7, p. 876–878, 2014.
- BRAGA, J. U.; BARRETO, A. M.; HIJJAR, M. A. Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil 1995-97, IERDTB. Parte III: Principais resultados. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 11, n. 1, p. 76–81, 2003.

- BRASIL. **Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos.** Brasília: Anvisa, 2004
- BRASIL. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias.** Brasília: Ministério da Saúde, 2008
- BRASIL. **Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes.** Brasília: Ministério da Saúde, 2009
- BRASIL. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde, 2011
- BRASIL. **Apresentação do Programa Nacional de Controle da Tuberculose.** Brasília: Ministério da Saúde, 2012
- BRASIL. **Relatório nº 49: Proposta de incorporação do Xpert MTB/RIF como teste para diagnóstico de tuberculose e para indicação de resistência à rifampicina.** Brasília: CONITEC, , 2013a.
- BRASIL. **Portaria nº 48, de 10 de setembro de 2013.** Brasília: Ministério da Saúde, , 2013b.
- BRASIL. **Guia de orientações para coleta do escarro.** Brasília: Ministério da Saúde, 2014
- BRASIL. **Rede de Teste Rápido para Tuberculose no Brasil Primeiro ano da implantação.** Brasília: Ministério da Saúde, 2015 Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/19/rtr-tb-15jan16-isbn-web.pdf>>
- BRASIL. **Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016.** Brasília: Ministério da Saúde, 2016
- BRASIL. **Boletim Epidemiológico 11.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018
- BRESLAUER, K. J. et al. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 83, p. 3746–3750, 1986.
- BROWN-ELLIOTT, B. A.; NASH, K. A.; WALLACE, R. J. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 545–582, 2012.
- BRUNELLO, F.; FAVARI, F.; FONTANA, R. Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria from various clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 1206–1209, 1999.
- BUKHARI, E. et al. Disseminated bacille Calmette-Guérin disease in Saudi children: clinical profile, microbiology, immunology evaluation and outcome. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 20, p. 3696–702, 2016.
- BURGOS, M. V.; PYM, A. S. Molecular epidemiology of tuberculosis. **European Respiratory Journal**, v. 20, n. Suppl. 36, p. 54s–65s, 2002.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical**

**Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

BUTLER, W. R. et al. Novel mycolic acid-containing bacteria in the family Segniliparaceae fam. nov., including the genus Segniliparus gen. nov., with descriptions of Segniliparus rotundus sp. nov. and Segniliparus rugosus sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1615–1624, 2005.

CÁCERES, O. et al. Characterization of the genetic diversity of extensively-drug resistant mycobacterium tuberculosis clinical isolates from pulmonary tuberculosis patients in Peru. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–22, 2014.

CAFRUNE, P. I. et al. Recent transmission of tuberculosis involving retired patients. **Journal of Infection**, v. 53, p. 370–376, 2006.

CAVIEDES, L. et al. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in sputum by microscopic observation of broth cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1203–1208, 2000.

CEPHEID. **Xpert MTB/RIF Training**. Disponível em: <[http://www.molecular.tb.org/gb/pdf/ppt/14\\_SYMP\\_ISoundiram\\_Xperttraining\\_2902.pdf](http://www.molecular.tb.org/gb/pdf/ppt/14_SYMP_ISoundiram_Xperttraining_2902.pdf)>.

CEYHAN, I.; SIMŞEK, H.; TARHAN, G. Comparison and evaluation of Lowenstein-Jensen medium and 2% Ogawa medium for the diagnosis of tuberculosis. **Mikrobiyoloji Bülteni**, v. 46, n. 1, p. 33–38, 2012.

CHAKRAVORTY, S. et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **J Microbiol Methods**, v. 69, n. 2, p. 330–339, 2007.

CHAKRAVORTY, S. et al. The New Xpert MTB/RIF Ultra: Improving Detection of Mycobacterium tuberculosis and Resistance to Rifampin in an Assay Suitable for Point-of-Care Testing. **mBio**, v. 8, n. 4, p. e00812-17, 2017.

CHANG, K. et al. Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: A meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 64, n. 6, p. 580–588, 2012.

CHEN, P. et al. A highly efficient Ziehl-Neelsen stain: Identifying de novo intracellular Mycobacterium tuberculosis and improving detection of extracellular M. tuberculosis in cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1166–1170, 2012.

CHIEN, H. P. et al. Comparison of the MB/BacT and BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria from clinical specimens. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, n. 9, p. 866–870, 2000.

CHOI, Y. et al. Conventional and real-time PCR targeting 16S ribosomal RNA for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 19, n. 9, p.



1102–8i, 2015.

COHEN, T.; SOMMERS, B.; MURRAY, M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 1, p. 13–21, 2003.

COHN, M. L.; WAGGONER, R. F.; MCCLATCHY, J. K. The 7H11 Medium for the Cultivation of *Mycobacteria*. **American Review of Respiratory Disease**, v. 98, n. 2, p. 295–296, 1968.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 1998.

COLLINS, D. M.; STEPHENS, D. M. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 83, p. 11–16, 1991.

CONCEIÇÃO, E. C. et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from Pará, Brazil, reveals a higher frequency of ancestral strains than previously reported in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 56, n. March, p. 62–74, 2017.

COUVIN, D.; ZOZIO, T.; RASTOGI, N. SpolSimilaritySearch – A web tool to compare and search similarities between spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Tuberculosis**, v. 105, p. 49–52, 2017.

COX, L. Sanatorium treatment contrasted with home treatment; after-histories of 4,067 cases. **The British Journal of Tuberculosis**, v. 17, n. 1, p. 27–30, 1923.

CRAMPIN, A. C. et al. Recurrent TB: relapse or reinfection? The effect of HIV in a general population cohort in Malawi. **AIDS**, v. 24, n. 3, p. 417–426, 2010.

DA SILVA ANTUNES, R.; PINTO, M.; TRAJMAN, A. Patient costs for the diagnosis of tuberculosis in Brazil: Comparison of Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF and smear microscopy. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 18, n. 5, p. 547–551, 2014.

DALE, J. W. et al. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: Recommendations for standardised nomenclature. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 5, n. 3, p. 216–219, 2001.

DAMATO, J. J. et al. Detection of mycobacteria by radiometric and standard plate procedures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 1066–1073, 1983.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862–1870, 2006.

DANTAS, N. G. T. et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Minas Gerais State, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2015.

- DAVIS, J. L. et al. Diagnostic accuracy of same-day microscopy versus standard microscopy for pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 147–154, 2013.
- DE CAMARGO, K. R. et al. The adoption of a new diagnostic technology for tuberculosis in two Brazilian cities from the perspective of patients and healthcare workers: a qualitative study. **BMC health services research**, v. 15, p. 275, 2015.
- DEMAY, C. et al. SITVITWEB - A publicly available international multimarker database for studying Mycobacterium tuberculosis genetic diversity and molecular epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 755–766, 2012.
- DENKINGER, C. M. et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. **European Respiratory Journal**, v. 44, n. 2, p. 435–446, 2014.
- DINARDO, A. R. et al. Culture is an imperfect and heterogeneous reference standard in pediatric tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 101, p. S105–S108, 2016.
- DINNES, J. et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. **Health Technology Assessment**, v. 11, n. 3, p. 1–196, 2007.
- DIVE. **Barriga Verde - Informativo Epidemiológico**. Florianópolis: [s.n.].
- DONALD, P. R.; MARAIS, B. J.; BARRY-III, C. E. Age and the epidemiology and pathogenesis of tuberculosis. **The Lancet**, v. 375, p. 1852–1854, 2010.
- DORSET, M. The Use of Eggs as a Medium for the Cultivation of Bacillus tuberculosis. **American Medicine**, v. 5, p. 555, 1902.
- DRANCOURT, M. et al. Blood Agar and Mycobacterium tuberculosis: the End of a Dogma. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1710–1711, 2003.
- DUBOS, R. J.; MIDDLEBROOK, G. Media for tubercle bacilli. **American Review of Tuberculosis**, v. 56, n. 4, p. 334–345, 1947.
- DYLEWSKI, J. Nucleic Acid Amplification Testing for the Diagnosis of Tuberculosis: Not for All. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 1, p. 1456–1457, 2009.
- EI, P. W. et al. Molecular Strain Typing of Mycobacterium tuberculosis: A Review of Frequently Used Methods. **Journal of Korean Medical Science**, v. 31, n. 11, p. 1673–1683, 2016.
- EUZEBY, J. P. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>>. Acesso em: 5 fev. 2016.
- FDA. **510(k) decision summary: De novo request for evaluation of**

- automatic class III designation for the Xpert® MTB/RIF Assay for use with the GeneXpert® Instrument Systems, including the GeneXpert® Diagnostic (Dx) Systems and the GeneXpert® Infinity Systems.** Washington: [s.n.]. Disponível em: <[http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/reviews/k131706.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/k131706.pdf)>.
- FENNELLY, K. P. et al. The small membrane filter method of microscopy to diagnose pulmonary tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2096–2099, 2012.
- FERRAZOLI, L. et al. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, n. October 1998, p. 18–25, 2000.
- FIELD, S. K. et al. Cough Due to TB and Other Chronic Infections. **Chest**, v. 153, n. 2, p. 467–497, 2018.
- FLORES, E. et al. Real-time PCR with internal amplification control for detecting tuberculosis: Method design and validation. **APMIS**, v. 117, p. 592–597, 2009.
- FRIEDRICH, S. O. et al. Assessment of the sensitivity and specificity of Xpert MTB/RIF assay as an early sputum biomarker of response to tuberculosis treatment. **Lancet Respiratory Medicine**, v. 1, n. 6, p. 462–470, 2013.
- FRITH, J. History of Tuberculosis. Part 1 – Phthisis, consumption and the White Plague. **Journal of Military and Veterans’ Health**, v. 22, n. 2, 2014.
- GAGNEUX, S. et al. The Competitive Cost of Antibiotic Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Science**, v. 312, n. 5782, p. 1944–1946, 2015.
- GLAZIOU, P. et al. Global epidemiology of tuberculosis. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v. 5, n. a017798, p. 1–17, 2015.
- GOLFETTO, L. **Deteção do HPV e da Chlamydia trachomatis em amostras de cérvix uterina de mulheres da cidade de São Miguel do Oeste.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.
- GONZÁLEZ DÍAZ, A. et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Havana, Cuba, 2009. **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 11, p. 1534–1542, 2015.
- GOPATHI, N. et al. A Comparative Study of Induced Sputum and Bronchial Washings in Diagnosing Sputum Smear Negative Pulmonary Tuberculosis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 3, p. OC07-OC10, 2016.
- GROENEN, P. M. A. et al. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1057–1065, 1993.
- GULD, J. et al. Suppurative Lymphadenitis Following Intradermal B.C.G. Vaccination of the Newborn - a Preliminary Report. **British Medical**

**Journal**, v. Oct. 29, p. 1048–1054, 1955.

GUPTA, A. et al. Immunobiology Mycobacterium tuberculosis: Immune evasion, latency and reactivation. **Immunobiology**, v. 217, n. 3, p. 363–374, 2012.

GUTIERREZ, M. C. et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. **PLoS Pathogens**, v. 1, n. 1, p. e5, 2005.

HAKAWI, A. M.; ALRAJHI, A. A. Tuberculosis of the bone marrow : clinico-pathological study of 22 cases from Saudi Arabia. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 10, n. 9, p. 1041–1044, 2006.

HALDAR, S. et al. Improved laboratory diagnosis of tuberculosis – The Indian experience. **Tuberculosis**, v. 91, p. 414–426, 2011.

HAYMAN, J. Mycobacterium Ulcerans: an Infection From Jurassic Time? **The Lancet**, v. 324, n. 8410, p. 1015–1016, 1984.

HELB, D. et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 229–237, 2010.

HOORFAR, J. et al. Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1863–1868, 2004.

HU. **Boletim Estatístico do Movimento Hospitalar - Maio/2016**. Disponível em: <[http://www.hu.ufsc.br/?page\\_id=3487](http://www.hu.ufsc.br/?page_id=3487)>. Acesso em: 24 nov. 2016a.

HU. **Boletim Estatístico do Movimento Hospitalar - Junho/2016**. Disponível em: <[http://www.hu.ufsc.br/?page\\_id=3487](http://www.hu.ufsc.br/?page_id=3487)>. Acesso em: 24 nov. 2016b.

HU. **Boletim Estatístico do Movimento Hospitalar - Julho/2016**. Disponível em: <[http://www.hu.ufsc.br/?page\\_id=3487](http://www.hu.ufsc.br/?page_id=3487)>. Acesso em: 24 nov. 2016c.

HU. **Boletim Estatístico do Movimento Hospitalar - Agosto/2016**. Disponível em: <[http://www.hu.ufsc.br/?page\\_id=3487](http://www.hu.ufsc.br/?page_id=3487)>. Acesso em: 24 nov. 2016d.

HU. **Boletim Estatístico do Movimento Hospitalar - Setembro/2016**. Disponível em: <[http://www.hu.ufsc.br/?page\\_id=3487](http://www.hu.ufsc.br/?page_id=3487)>. Acesso em: 24 nov. 2016e.

HU. **Boletim Estatístico do Movimento Hospitalar - Outubro/2016**. Disponível em: <[http://www.hu.ufsc.br/?page\\_id=3487](http://www.hu.ufsc.br/?page_id=3487)>. Acesso em: 24 nov. 2016f.

HUBER, J. et al. Mycobacterium bohemicum and Cervical Lymphadenitis in Children. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1158–1159, 2008.

ISEMAN, M. D. Tuberculosis therapy: past, present and future. **European**

- Respiratory Journal**, v. 20, n. Supplement 36, p. 87S–94s, 2002.
- ISLAM, M. R. et al. Yield of Two Consecutive Sputum Specimens for the Effective Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 8–11, 2013.
- JAGIELSKI, T. et al. Current methods in the molecular typing of Mycobacterium tuberculosis and other mycobacteria. **BioMed Research International**, v. 645802, 2014.
- JASPE, R. C. et al. Evaluation of the Kudoh swab method for the culturing of Mycobacterium tuberculosis in rural areas. **Tropical medicine and International Health**, v. 14, n. 4, p. 468–471, 2009.
- JOLOBA, M. L. et al. What is the most reliable solid culture medium for tuberculosis treatment trials? **Tuberculosis**, v. 94, n. 3, p. 311–316, 2014.
- JONES, M. et al. **MTB-RIF Ultra - design and analytical performance of a second generation GeneXpert assay**. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **Anais...**Viena: 2016
- KAMERBEEK, J. et al. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 907–914, 1997.
- KANDUMA, E.; MCHUGH, T. D.; GILLESPIE, S. H. Molecular methods for Mycobacterium tuberculosis strain typing: a users guide. **J Appl Microbiol**, v. 94, n. 5, p. 781–791, 2003.
- KASSAZA, K. et al. Lowenstein-Jensen selective medium for reducing contamination in Mycobacterium tuberculosis culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2671–2673, 2014.
- KATO-MAEDA, M.; METCALFE, J.; FLORES, L. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis: application in epidemiologic studies. **Future Microbiol**, v. 6, n. 2, p. 203–216, 2015.
- KAUFMANN, S. H. E.; SCHAIBLE, U. E. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 469–475, 2005.
- KOCK, R. The etiology of tuberculosis. **Berliner Klinischen Wochenschrift**, v. 15, p. 221–230, 1882.
- KOHL, T. A. et al. Whole-genome-based Mycobacterium tuberculosis surveillance: A standardized, portable, and expandable approach. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2479–2486, 2014.
- KUBICA, G. P. et al. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 87, p. 775–779, 1963.
- KUDOH, S.; KUDOH, T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 51, n. 1, p. 71–82, 1974.
- KUMAR, R. et al. Bronchoscopy in immediate diagnosis of smear negative tuberculosis. **Pneumonologia i Alergologia Polska**, v. 82, n. 5, p. 410–414, 2014.
- KUNKEL, A. et al. Smear positivity in paediatric and adult tuberculosis:

- systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 282, 2016.
- LAMBERT, M. et al. Recurrence in tuberculosis: relapse or reinfection? **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 282–287, 2003.
- LAWN, S. D.; ZUMLA, A. I. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 378, p. 57–72, 2011.
- LEÃO, S. C.; PORTAELS, F. Chapter 1: History. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. (Eds.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. Antuérpia, São Paulo, Buenos Aires: [s.n.].
- LEBOFFE, M. J.; PIERCE, B. E. **A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory**. 4<sup>a</sup> ed. ed. Englewood: Morton Publishing Company, 2011.
- LEE, J. S. et al. The incidence and clinical implication of sputum with positive acid-fast bacilli smear but negative in mycobacterial culture in a tertiary referral hospital in South Korea. **Journal of Korean Medical Science**, v. 23, n. 5, p. 767–771, 2008.
- LEE, J. Y. Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 78, n. 2, p. 47–55, 2015.
- LIGHT, R. W. Update on tuberculous pleural effusion. **Respirology**, v. 15, p. 451–458, 2010.
- LIRA, L. A. S. et al. Evaluation of a IS6110-Taqman real-time PCR assay to detect Mycobacterium tuberculosis in sputum samples of patients with pulmonary TB. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 1103–1108, 2012.
- LOK, K. H. et al. Molecular differentiation of Mycobacterium tuberculosis strains without IS6110 insertions. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 1310–1313, 2002.
- LU, W. et al. Genotypes of Mycobacterium tuberculosis isolates in rural China: Using MIRU-VNTR and spoligotyping methods. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 98–106, 2014.
- LUNGE, V. R. et al. Factors affecting the performance of 5' nuclease PCR assays for Listeria monocytogenes detection. **Journal of Microbiological Methods**, v. 51, p. 361–368, 2002.
- MACIEL, E. L. N. et al. Guided sputum sample collection and culture contamination rates in the diagnosis of pulmonary TB. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 5, p. 460–463, 2009.
- MAGDALENA, J. et al. Identification of a New DNA Region Specific for Members of Mycobacterium tuberculosis Complex Identification of a New DNA Region Specific for Members of Mycobacterium tuberculosis Complex. v. 36, n. 4, p. 937–943, 1998.
- MARRAKCHI, H.; LANÉELLE, M. A.; DAFFÉ, M. Mycolic acids: Structures, biosynthesis, and beyond. **Chemistry and Biology**, v. 21, n. 1, p. 67–85, 2014.

- MARSHALL, G. et al. Streptomycin Treatment of Pulmonary Tuberculosis. **British Medical Journal**, v. 771, p. 4582, 1948.
- MASE, S. R. et al. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: A systematic review. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 11, n. 5, p. 485–495, 2007.
- MATHUR, M. L. et al. Rapid culture of Mycobacterium tuberculosis on blood agar in resource limited setting. **Danish medical bulletin**, v. 56, n. 4, p. 208–10, 2009.
- MATHYS, V. et al. False-positive rifampicin resistance on Xpert<sup>®</sup>MTB/RIF caused by a silent mutation in the rpoB gene. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 18, n. 10, p. 1255–1257, 2014.
- MAYER, T. A. et al. Inhalational anthrax due to bioterrorism: Would current centers for disease control and prevention guidelines have identified the 11 patients with inhalational anthrax from october through November 2001? **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 10, p. 1275–1283, 2003.
- MAYNARD-SMITH, L. et al. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary and pulmonary tuberculosis when testing non-respiratory samples: a systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 709, 2014.
- MAZÓN, A. et al. Diagnostic of tuberculous arthritis from the isolation of Mycobacterium tuberculosis in blood and chocolate agar plates. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 18, n. 10, p. 527–528, 2000.
- MCEVOY, C. R. E. et al. The role of IS6110 in the evolution of Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 87, n. 5, p. 393–404, 2007.
- MEDEIROS, T. F. et al. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis strains from prison populations in Santa Catarina , Southern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 58, n. December 2017, p. 34–39, 2018.
- MEDICAL-RESEARCH-COUNCIL. Various Combinations of Isoniazid with Streptomycin or with P.A.S. in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis. **British Medical Journal**, v. 436, 1955.
- MEHTA, P. K. et al. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 20–36, 2012.
- METCALFE, J. Z. et al. Suboptimal specificity of Xpert MTB/RIF among treatment-experienced patients. **European Respiratory Journal**, v. 45, n. 5, p. 1504–1506, 2015.
- MIDDLEBROOK, G.; COHN, M. L. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. **American journal of public health**, v. 48, n. 7, p. 844–853, 1958.
- MIDDLEBROOK, G.; REGGIARDO, Z.; TIGERTT, W. D. Automatable

- radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. **Am Rev Respir Dis**, v. 115, n. 6, p. 1066–1069, 1977.
- MITCHISON, D. A. et al. A selective oleic acid albumin agar medium for tubercle bacilli. **Journal of Medical Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 165–175, 1972.
- MOORE, D. A. J. et al. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. **The New England journal of medicine**, v. 355, n. 15, p. 1539–1550, 2006.
- MORRIS, M. D. et al. Social, Economic, and Psychological Impacts of MDR-TB Treatment in Tijuana, Mexico: A Patient's Perspective. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 17, n. 7, p. 954–960, 2014.
- MORRISON, J.; PAI, M.; HOPEWELL, P. C. Tuberculosis and latent tuberculosis infection in close contacts of people with pulmonary tuberculosis in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 8, p. 359–368, 2008.
- NAHID, P. et al. Clinical research and development of tuberculosis diagnostics: Moving from silos to synergy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. SUPPL. 2, p. 159–168, 2012.
- NGUYEN, L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 7, p. 1585–1604, 2016.
- NOGUEIRA, C. L. et al. First insight into the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina, southern Brazil. **Tuberculosis**, v. 97, p. 57–64, 2016.
- NWOKOYE, N. N. et al. Evaluation of direct and concentrated smear microscopy for TB diagnosis in HIV prevalence setting. **Abstracts of the 43<sup>rd</sup> Union World Conference on Lung Health**, v. PS101089-1, 2012.
- OCHERETINA, O. et al. False-positive rifampin resistant results with Xpert MTB/RIF version 4 assay in clinical samples with a low bacterial load. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 1, p. 53–55, 2016.
- PALACI, M. et al. Evaluation of *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (m{spgitt}) for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 762–764, 1996.
- PALACI, M. et al. Contribution of the Ogawa-Kudoh swab culture method to the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Brazil. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 17, n. 6, p. 782–786, 2013.
- PALACIOS, J. J. et al. Fully automated liquid culture system compared with Lowenstein-Jensen solid medium for rapid recovery of *Mycobacteria* from clinical samples. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 265–273, 1999.
- PALMERO, D. Tuberculosis and HIV/AIDS. In: PALOMINO, J. C.;



- LEÃO, S. C.; RITACCO, V. (Eds.). . **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. Antuérpia, São Paulo, Buenos Aires: [s.n].
- PAN, X. L. et al. A quantitative and efficient approach to select MIRU-VNTR loci based on accumulation of the percentage differences of strains for discriminating divergent *Mycobacterium tuberculosis* sublineages. **Emerging microbes & infections**, v. 6, n. 7, p. e68, 2017.
- PARISH, T. et al. The senX3-regX3 two-component regulatory system of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence. **Microbiology**, v. 149, p. 1423–1435, 2003.
- PEÑUELAS-URQUIDES, K. et al. Measuring of *Mycobacterium tuberculosis* growth. A correlation of the optical measurements with colony forming units. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 290, p. 287–290, 2013.
- PETER, J. G. et al. Comparison of two methods for acquisition of sputum samples for diagnosis of suspected tuberculosis in smear-negative or sputum-scarce people: a randomised controlled trial. **Lancet Respiratory Medicine**, v. 1, n. 6, p. 471–478, 2013.
- PETROFF, S. A. Some cultural studies on the tubercle bacillus. **Johns Hopkins Hospital Bulletin**, v. XXVI, n. 276, 1915.
- PFYFFER, G. E. et al. Comparison of the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 364–368, 1997.
- PHILIPP, W. J. et al. An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. April, p. 3132–3137, 1996.
- PIERSIMONI, C. et al. Comparison of MB/BacT ALERT 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: A multicenter study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 651–657, 2001.
- PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C. Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Samples. **Journal of CLinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5355–5365, 2003.
- PINTO, M. et al. Cost-effectiveness of the Xpert?? MTB/RIF assay for tuberculosis diagnosis in Brazil. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 20, n. 5, p. 611–618, 2016.
- PINTO, M. F. T. et al. Impacto orçamentário da incorporação do GeneXpert MTB / RIF para o diagnóstico da tuberculose pulmonar na perspectiva do Sistema Único de Saúde , Brasil , 2013-2017 Budget impact of the incorporation of GeneXpert MTB / RIF for diagnosis of pulmonary tuber. v. 33, n. 9, p. 1–13, 2017.
- PRIM, R. I. et al. Molecular profiling of drug resistant isolates of

Mycobacterium tuberculosis in the state of Santa Catarina, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. ahead of print, 2015.

QUINCÓ, P. et al. Increased sensitivity in diagnosis of tuberculosis in HIV-positive patients through the small-membrane-filter method of microscopy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 9, p. 2921–2925, 2013.

RAO, G. N. et al. Induced sputum versus bronchial washings in the diagnosis of sputum negative pulmonary tuberculosis. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 5, n. 2, p. 435–439, 2016.

RASOAHANITRALISOA, R. et al. Evaluation of spoligotyping, SNPs and customised MIRU-VNTR combination for genotyping Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Madagascar. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–14, 2017.

REED, J. L. et al. Highly sensitive sequence specific qPCR detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens. **Tuberculosis**, v. 101, p. 114–124, 2016.

RICHARDSON, E. T.; SAMSON, D.; BANAEI, N. Rapid Identification of Mycobacterium tuberculosis and Nontuberculous Mycobacteria by Multiplex, Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1497–1502, 2009.

RIEDER, H. et al. **Priorities for Tuberculosis Bacteriology Services in Low-Income Countries**. [s.l.: s.n.].

RIVAS, C. et al. Performance of the Ogawa-Kudoh method for isolation of mycobacteria in a laboratory with large-scale workload. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 42, n. 2, p. 87–90, 2010.

RODRIGUES, L. et al. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the Mycobacterium tuberculosis complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 695–700, 2012.

ROYCHOWDHURY, T.; MANDAL, S.; BHATTACHARYA, A. Analysis of IS6110 insertion sites provide a glimpse into genome evolution of Mycobacterium tuberculosis. **Scientific Reports**, v. 5, n. 12567, p. 1–10, 2015.

ROZO-ANAYA, J. C.; RIBÓN, W. Molecular tools for Mycobacterium tuberculosis genotyping. **Revista de Salud Pública**, v. 12, n. 3, p. 510–521, 2010.

SANJUAN-JIMENEZ, R. et al. Amplicon DNA Melting Analysis for the Simultaneous Detection of Brucella spp and Mycobacterium tuberculosis Complex. Potential Use in Rapid Differential Diagnosis between Extrapulmonary Tuberculosis and Focal Complications of Brucellosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–9, 2013.

SANJUAN-JIMENEZ, R. et al. Comparative study of a real-time PCR assay targeting senX3-regX3 versus other molecular strategies commonly used in the diagnosis of tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0143025, 2015.

- SANKAR, S. et al. Analysis of sequence diversity among IS6110 sequence of *Mycobacterium tuberculosis*: possible implications for PCR based detection. **Bioinformation**, v. 6, n. 7, p. 6–8, 2011.
- SANTOS, F. C. F. et al. Performance of the IS6110-TaqMan® assay in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis from different biological samples. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 3, p. 331–337, 2018.
- SCHATZ, A.; BUGIE, E.; WAKSMAN, S. A. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. v. 55, n. 1, p. 66–69, 1944.
- SCHEFFER, M. C. **Influência de fatores de risco do paciente e de características de *Mycobacterium tuberculosis* no desfecho dos casos novos de tuberculose pulmonar tratados com esquema básico: uma coorte prospectiva de dois anos na Grande Florianópolis/SC.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.
- SEHGAL, I. S. et al. Diagnostic Performance of Xpert MTB / RIF in Tuberculous Pleural Effusion: Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1133–1136, 2016.
- SENNA, S. G. et al. In house reverse line hybridization assay for rapid detection of susceptibility to rifampicin in isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 2, p. 385–389, 2006.
- SEONG, G. M. et al. Usefulness of Sputum Induction with Hypertonic Saline in a Real Clinical Practice for Bacteriological Yields of Active Pulmonary Tuberculosis. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 76, n. 4, p. 163–168, 2014.
- SILVA, C. et al. Mycobacterial interspersed repetitive unit typing and mutational profile for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis surveillance in Portugal: A 3-year period overview. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 6, p. 546–551, 2014.
- SILVA, P. A.; AINSA, J. A. Chapter 18: Drugs and Drug Interaction. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. (Eds.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. Antuérpia, São Paulo, Buenos Aires: [s.n.].
- SMILJIC, S. et al. Differences and similarities between the symptoms and clinical signs in patients with pulmonary tuberculosis and pneumonia. **Vojnosanitetski pregled**, v. 1, 2017.
- SMITHWICK, R. W.; STRATIGOS, C. B. Acid-fast microscopy on polycarbonate membrane filter sputum sediments. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 1109–1113, 1981.
- SQUIRE, S. B. et al. “Lost” smear-positive pulmonary tuberculosis cases: Where are they and why did we lose them? **International Journal of**

**Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, n. 1, p. 25–31, 2005.

SREEVATSAN, S. et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 18, p. 9869–9874, 1997.

STEINGART, K. R. et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. v. 6, n. September, p. 1–3, 2006a.

STEINGART, K. R. et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 10, p. 664–674, 2006b.

STEINGART, K. R. et al. Xpert MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults (Review). **The Cochrane Library**, p. 1–165, 2014.

SUBHASH, H. et al. Pulmonary nocardiosis in human immunodeficiency virus infection: a tuberculosis mimic. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 47, n. 1, p. 30–32, 2001.

SUPPLY, P. et al. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 762–771, 2000.

SUPPLY, P. et al. Proposal for Standardization of Optimized *Mycobacterium tuberculosis* Interspersed Repetitive Unit – Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4498–4510, 2006.

TAKAO, E. K. H. et al. Comparação de métodos de cultivo para o diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar. **Acta Scientiarum - Health Sciences**, v. 27, n. 2, p. 183–188, 2005.

TESSEMA, B. et al. Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in Northwest Ethiopia: new phylogenetic lineages found in Northwest Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 131, 2013.

THERON, G. et al. Xpert MTB/RIF Results in Patients With Previous Tuberculosis: Can We Distinguish True From False Positive Results? **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 8, p. 995–1001, 2016.

THOLCKEN, C. A.; HUANG, S.; WOODS, G. L. Evaluation of the ESP culture system II for recovery of mycobacteria from blood specimens collected in isolator tubes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2681–2682, 1997.

TORTOLI, E. et al. Clinical validation of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. **European Respiratory Journal**, v. 40, n. 2, p. 442–447, 2012.

TORTOLI, E. et al. Cervical Lymphadenitis Due to *Mycobacterium bohemicum*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 211–212, 2018.

- TURNER, R. D. et al. Cough prevalence and frequency in pulmonary tuberculosis. **Thorax**, v. 69, n. Suppl 2, p. A43–A44, 2014.
- ULRICH, M. P. et al. Evaluation of the Cepheid GeneXpert?? system for detecting Bacillus anthracis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 5, p. 1011–1016, 2006.
- VAN SOOLINGEN, D. et al. DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 196–204, 1994.
- VARMA-BASIL, M. et al. Comparison of spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive units typing and IS6110-RFLP in a study of genotypic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Delhi, North India. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 524–535, 2011.
- VASCONCELLOS, S. E. G. et al. Strain classification of mycobacterium tuberculosis isolates in brazil based on genotypes obtained by spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive unit typing and the presence of large sequence and single nucleotide polymorphism. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.
- VELAYATI, A. A. et al. Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: Super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. **Chest**, v. 136, n. 2, p. 420–425, 2009.
- VENTER, R. et al. Mycobacterial genomic DNA from used Xpert MTB/RIF cartridges can be utilised for accurate second-line genotypic drug susceptibility testing and spoligotyping. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.
- VIEDMA, D. G. DE; MOKROUSOV, I.; RASTOGI, N. Innovations in the molecular epidemiology of tuberculosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. Supl. 1, p. 8–13, 2011.
- VINHAS, S. A. et al. Mycobacterium tuberculosis DNA fingerprint clusters and its relationship with RDRio genotype in Brazil. **Tuberculosis**, v. 93, n. 2, p. 207–212, 2013.
- WANG, Q. et al. Molecular Epidemiology and Clinical Characteristics of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis in a Tuberculosis Referral Hospital in China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110209, 2014.
- WHITELAW, A. et al. Comparative cost and performance of light-emitting diode microscopy in HIV-tuberculosis-co-infected patients. **European Respiratory Journal**, v. 38, n. 6, p. 1393–1397, 2011.
- WHO. **Handbook of Resolutions and Decisions, vol. 3**. Geneva: World Health Organization, 1991
- WHO. **Laboratory Services in Tuberculosis Control, Part III: Culture (WHO/TB/98.258)**. Geneva: World Health Organization, 1998
- WHO. **The Stop TB Strategy – Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millenium Development Goals**. Geneva: World Health Organization, 2006a
- WHO. **A estratégia STOP TB**. Geneva: World Health Organization,

2006b

WHO. **Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low and medium income settings.** Geneva: World Health Organization, 2007

WHO. **Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis - Policy Statement (WHO/HTM/TB/2011.8).** Geneva: World Health Organization, 2011

WHO. **Global Tuberculosis Report 2012 (WHO/HTM/TB/2012.6).** Geneva: World Health Organization, 2012

WHO. **TB Xpert Project.** Geneva: World Health Organization, 2013a

WHO. **The End TB Strategy.** Geneva: World Health Organization, 2013b

WHO. **Definitions and reporting framework for tuberculosis 2013 revision, updated December 2014 (WHO/HTM/TB/2013.2).** Geneva: World Health Organization, 2013c

WHO. **Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis (WHO/HTM/TB/2014.11).** Geneva: World Health Organization, 2014a

WHO. **Frequently Asked Questions on Xpert MTB/RIF assay.** Geneva: [s.n.].

WHO. **Xpert MTB/RIF implementation manual - Technical and operational 'how-to': practical considerations.** Geneva: [s.n.].

WHO. **Implementing tuberculosis diagnostics: A policy framework (WHO/HTM/TB/2015.11).** Geneva: World Health Organization, 2015

Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/implementing\\_TB\\_diagnostics/en/](http://www.who.int/tb/publications/implementing_TB_diagnostics/en/)

WHO. **Global Tuberculosis Report (WHO/HTM/TB/2016.13).** Geneva: World Health Organization, 2016

WHO. **Global TB Report 2017 (WHO/HTM/TB/2017.23).** [s.l.: s.n.].

WILDNER, L. M. et al. Micobactérias: Epidemiologia E Diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 3, p. 207–229, 2011.

WITNEY, A. A. et al. Use of whole-genome sequencing to distinguish relapse from reinfection in a completed tuberculosis clinical trial. **BMC Medicine**, v. 15, n. 71, p. 1–13, 2017.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221–271, 1987.

WONG, P. Management of tuberculous pleuritis: Can we do better? **Respirology**, v. 10, p. 144–148, 2005.

WOODS, G. L. et al. Clinical evaluation of Difco ESP Culture System II for growth and detection of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 121–124, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Treatment of Tuberculosis - Guidelines.** [s.l.] WHO, 2010.

XIE, Y. L. et al. Evaluation of a Rapid Molecular Drug- Susceptibility Test

for Tuberculosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 11, p. 1043–1054, 2017.

YAN, L.; XIAO, H.; ZHANG, Q. **Systematic review: Comparison of Xpert MTB/RIF, LAMP and SAT methods for the diagnosis of pulmonary tuberculosis**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. v. 96

YANG, C. et al. Transmission of Mycobacterium tuberculosis in China: A Population-Based Molecular Epidemiologic Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 2, p. 219–227, 2015.

YEAGER, H. et al. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 95, n. 6, p. 998–1004, 1967.

ZHANG, J. et al. Mycobacterium tuberculosis complex CRISPR genotyping: Improving efficiency, throughput and discriminative power of “spoligotyping” with new spacers and a microbead-based hybridization assay. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 285–294, 2010.

ZHANG, Y.; YEW, W.-W. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: update 2015. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 19, n. 11, p. 1276–89, 2015.

ZUMLA, A.; NAHID, P.; COLE, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 5, p. 388–404, 2013.

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR E MICOBACTÉRIAS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa de doutorado intitulada "DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE *M. tuberculosis* E COMPARAÇÃO COM TESTE COMERCIAL XPERT MTB/RIF E METODOS FENOTÍPICOS EM AMOSTRAS PULMONARES E EXTRAPULMONARES RECEBIDAS NA DIVISÃO DE ANÁLISES CLÍNICAS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO/UFSC", que fará exames complementares com as amostras já coletadas, tendo como objetivo melhorar o diagnóstico da tuberculose a fim de diminuir o tempo para entrega dos resultados e aumentar a sensibilidade dos exames realizados atualmente. A coleta de dados clínicos e epidemiológicos será realizada através de um questionário e no seu prontuário no HU.

Para a pesquisa será utilizada uma alíquota das amostras já coletadas para os demais exames solicitados pelo seu médico. Os riscos destes procedimentos serão mínimos. Durante a entrevista você pode se sentir cansado ou aborrecido para responder ao questionário. Nesses casos você pode optar por parar de responder as perguntas ou até solicitar algum tempo para descansar e retomar caso se sinta a vontade. Você tem a garantia de poder solicitar esclarecimentos ao pesquisador sempre que desejar (antes e durante sua realização) e de quaisquer dúvidas, incluindo os procedimentos e etapas de desenvolvimento desta pesquisa. A sua identidade será preservada, pois cada indivíduo será identificado por um número.

Em caso de recusa ou desistência você não será penalizado (a) de forma alguma. Você poderá se retirar do estudo a qualquer momento. Não há despesas pessoais para o (a) participante em qualquer fase do estudo, mas os pesquisadores se comprometem a garantir o ressarcimento de eventuais despesas decorrentes da pesquisa. Também não há compensação financeira para quem participar da pesquisa. Apesar dos riscos da pesquisa serem mínimos, também nos comprometemos a garantir indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

O benefício em participar deste estudo será diminuir o tempo para diagnosticar a tuberculose, possibilitando ao paciente um início mais rápido do tratamento. Você pode não ser beneficiado diretamente, mas contribuirá para que outros pacientes tenham um diagnóstico mais rápido e melhor.

As pessoas que estarão acompanhando os procedimentos serão os pesquisadores estudante de doutorado Rodrigo Ivan Prim e professora responsável Maria Luiza Bazzo. Os pesquisadores responsáveis por este estudo declaram que este TCLE está em cumprimento com as exigências contidas do item IV. 3 da Resolução 466/12.

Solicitamos a sua autorização para o uso de seus dados para a produção de artigos técnicos e científicos. A sua privacidade será mantida através da não-identificação do seu nome.

Este termo de consentimento livre e esclarecido é feito em duas vias, sendo que uma delas ficará em poder dos pesquisadores e outra com o participante da pesquisa.

Agradecemos a sua participação.

Rodrigo Ivan Prim e Profa. Maria Luiza Bazzo  
48 3721 8148

Laboratório de Pesquisa III-Divisão de Análises Clínicas-Hospital Universitário-UFSC  
Rua Professora Maria Flora Pausewang, s/n. Bairro Trindade. Florianópolis/SC

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEPESH/UFSC  
R: Desembarçador Vítor Lima, n° 222, 4° andar, sala 401 (Reitoria II)  
Trindade  
88040-400 – Florianópolis – SC



**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa e, que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao projeto e, que todos os dados a meu respeito serão sigilosos. Eu compreendo que neste estudo, os exames serão feitos em minhas amostras biológicas, e que fui informado que posso me retirar do estudo a qualquer momento.

Nome por extenso do participante \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof. Maria Luiza Bazzo

\_\_\_\_\_  
Msc. Rodrigo Ivan Prim

## APÊNDICE B – Termo Consentimento Livre e Esclarecido para dependentes e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR E MICOBACTÉRIAS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) seu(ua) dependente está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa de doutorado intitulada "DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE *M. tuberculosis* E COMPARAÇÃO COM TESTE COMERCIAL XPERT MTB/RIF E METODOS FENOTÍPICOS EM AMOSTRAS PULMONARES E EXTRAPULMONARES RECEBIDAS NA DIVISÃO DE ANÁLISES CLÍNICAS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO/UFSC", que fará exames complementares com as amostras já coletadas, tendo como objetivo melhorar o diagnóstico da tuberculose a fim de diminuir o tempo para entrega dos resultados e aumentar a sensibilidade dos exames realizados atualmente. A coleta de dados clínicos e epidemiológicos será realizada através de um questionário e no prontuário do(a) seu(ua) dependente no HU.

Para a pesquisa será utilizada uma alíquota das amostras já coletadas para os demais exames solicitados pelo seu médico. Os riscos destes procedimentos serão mínimos. Durante a entrevista seu(ua) dependente pode se sentir cansado ou aborrecido para responder ao questionário. Nesses casos seu(ua) dependente pode optar por parar de responder as perguntas ou até solicitar algum tempo para descansar e retornar caso se sinta à vontade. Você e seu(ua) dependente têm a garantia de poder solicitar esclarecimentos ao pesquisador sempre que desejar (antes e durante sua realização) e de quaisquer dúvidas, incluindo os procedimentos e etapas de desenvolvimento desta pesquisa. A identidade do(a) seu(ua) dependente será preservada, pois cada indivíduo será identificado por um número.

Em caso de recusa ou desistência seu(ua) dependente não será penalizado (a) de forma alguma. Seu(ua) dependente poderá se retirar do estudo a qualquer momento. Não há despesas pessoais para o (a) participante em qualquer fase do estudo, mas os pesquisadores se comprometem a garantir o ressarcimento de eventuais despesas decorrentes da pesquisa. Também não há compensação financeira para quem participar da pesquisa. Apesar dos riscos da pesquisa serem mínimos, também nos comprometemos a garantir indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

O benefício em participar deste estudo será diminuir o tempo para diagnosticar a tuberculose, possibilitando ao paciente um início mais rápido do tratamento. Seu(ua) dependente pode não ser beneficiado diretamente, mas contribuirá para que outros pacientes tenham um diagnóstico mais rápido e melhor.

As pessoas que estarão acompanhando os procedimentos serão os pesquisadores estudante de doutorado Rodrigo Ivan Prim e professora responsável Maria Luiza Bazzo. Os pesquisadores responsáveis por este estudo declaram que este TCLE está em cumprimento com as exigências contidas do item IV. 3 da Resolução 466/12.

Solicitamos a sua autorização para o uso dos dados do(a) seu(ua) dependente para a produção de artigos técnicos e científicos. A sua privacidade será mantida através da não-identificação do nome dele(a).

Este termo de consentimento livre e esclarecido é feito em duas vias, sendo que uma delas ficará em poder dos pesquisadores e outra com o participante da pesquisa.

Agradecemos a sua participação.

Rodrigo Ivan Prim e Profa. Maria Luiza Bazzo  
48 3721 8148

Laboratório de Pesquisa III-Divisão de Análises Clínicas-Hospital Universitário-UFSC  
Rua Professora Maria Flora Pausewang, s/n. Bairro Trindade. Florianópolis/SC

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEPESH/UFSC  
R: Desembargador Vitor Lima, n° 222, 4° andar, sala 401 (Reitoria II)  
Trindade

88040-400 – Florianópolis – SC

**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa e, que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao projeto e, que todos os dados a respeito de meu(minha) dependente serão sigilosos. Eu compreendo que neste estudo, os exames serão feitos em amostras biológicas do(a) meu(minha) dependente, e que fui informado que posso me retirá-lo do estudo a qualquer momento.

Nome por extenso do(a) responsável \_\_\_\_\_

Nome por extenso do(a) dependente \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof. Maria Luiza Bazzo

\_\_\_\_\_  
Msc. Rodrigo Ivan Prim

### **Termo de assentimento do menor**

Eu \_\_\_\_\_ aceito participar da pesquisa "DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE M. tuberculosis E COMPARAÇÃO COM TESTE COMERCIAL XPRT MTB/RIF E MÉTODOS FENOTÍPICOS EM AMOSTRAS PULMONARES E EXTRAPULMONARES RECEBIDAS NA DIVISÃO DE ANÁLISES CLÍNICAS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO/UFSC", e sei que serão feitos mais exames na amostra biológica que eu coletar conforme o pedido do médico que me atendeu, e que irei responder a algumas perguntas. Sei que posso concordar ou não em participar sem prejuízo do meu exame e sei também que a qualquer momento posso desistir da minha participação.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do menor

# ANEXO A – Artigo “Molecular profiling of drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in the state of Santa Catarina, southern Brazil”.

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro: 1-6, 2015 1

## Molecular profiling of drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in the state of Santa Catarina, southern Brazil

Rodrigo Ivan Prim<sup>1</sup>, Marcos André Schörner<sup>1</sup>, Simone Gonçalves Senna<sup>1</sup>,  
Christiane Lourenço Nogueira<sup>1</sup>, Anna Carolina Cançado Figueiredo<sup>2</sup>,  
Jaquelline Germano de Oliveira<sup>2</sup>, Darcita Bürger Rovaris<sup>3</sup>, Maria Luiza Bazzo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de Biologia Molecular, Sorologia e Micobactérias, Florianópolis, SC, Brasil

<sup>2</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

*Drug resistance is a global threat and one of the main contributing factors to tuberculosis (TB) outbreaks. The goal of this study was to analyse the molecular profile of multidrug-resistant TB (MDR-TB) in the state of Santa Catarina in southern Brazil. Fifty-three MDR Mycobacterium tuberculosis clinical isolates were analysed by spoligotyping and a partial region of the rpoB gene, which is associated with rifampicin resistance (RMP-R), was sequenced. Some isolates were also distinguished by their mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU). S531L was the most prevalent mutation found within rpoB in RMP-R isolates (58.5%), followed by S531W (20.8%). Only two MDR isolates showed no mutations within rpoB. Isolates of the Latin American Mediterranean (LAM) family were the most prevalent (45.3%) found by spoligotyping, followed by Haarlem (9.4%) and T (7.5%) families. SIT106 was found in 26.4% of isolates and all SIT106 isolates typed by MIRU-12 (5 out of 14) belong to MIRU-12. There was a high correlation between the S531W mutation and the LAM family mainly because all SIT2263 (LAM9) isolates carry this mutation. Among isolates with the S531W mutation in rpoB MIRU demonstrates a cluster formed by four isolates (SIT2263 and MIT163) and very similar profiles were observed between eight of the nine isolates. Better characterization of TB isolates may lead to new ways in which to control and treat TB in this region of Brazil.*

Key words: tuberculosis - MDR-TB - rpoB - spoligotyping - MIRU

Among the many infectious diseases, tuberculosis (TB) remains the world's leading cause of death. Despite the advances in TB therapy over the past century, there were an estimated nine million new cases and 1.1 million deaths in 2013 (WHO 2014). Mycobacterial drug resistance is a global threat and one of the main problems associated with this illness, as evidenced by multidrug-resistant TB (MDR-TB). For MDR-TB, multidrug resistance is defined as resistance to isoniazid (INH) and rifampicin (RMP), the two key drugs used to treat TB. Thus, MDR-TB requires second-line drugs for treatment, which are more toxic, expensive and less efficient (Dye & Williams 2000, Espinal 2013).

The acquisition of resistance by *Mycobacterium tuberculosis* occurs spontaneously due to the natural mutation rate of genomic DNA and there are no known plasmids that confer resistance (Riska et al. 2000). The molecular basis of RMP resistance is mainly due to several mutations within the 81-bp hotspot region of the *rpoB* gene (corresponding to codons 507-533), most fre-

quently at codons 531, 526 and 516. This gene encodes the  $\beta$ -subunit of the *M. tuberculosis* RNA polymerase (RNAP), the target of RMP (Teletni et al. 1993). Mutations in this hotspot region are found in almost 96% of RMP-resistant strains, making *rpoB* the molecular marker of multidrug resistance and, in fact, the majority of the RMP-resistant isolates are MDR-TB (Somoskovi et al. 2001, Sam et al. 2006, Zhang & Yew 2009).

Genotyping tools are used to elucidate the distribution of TB and its transmission dynamics in the population (Demay et al. 2012). Spoligotyping is a genotyping technique based on the polymorphism of the direct repeat (DR) locus present within *M. tuberculosis*. The DR contains 36-bp well-conserved repeat sequences interspersed with 34-41-bp nonrepetitive spacers. The profile of the presence/absence of the 43 spacers is compared to more than 58,000 strains deposited in the SITVIT-WEB database (pasteur-guadalupe.fr:8081/SITVITD) (Kamerbeek et al. 1997, Demay et al. 2012). Another important genotyping method is based on the copy number of the variable number tandem repeats of mycobacterial interspersed repeat units (MIRU-VNTR) (Supply et al. 2000). In fact, out of the 41 loci that contain MIRUs, the most prevalent VNTRs are the 12, 15 and 24-loci.

Despite the relevance of drug resistance to the treatment and control of TB and MDR-TB, few studies have been published about circulating resistant strains in Brazil. Thus, the aim of this study was to analyse the molecular profile of MDR-TB strains in the state of Santa Catarina (SC), Brazil.

doi: 10.1590/0074-02760150100

Financial support: CNPq (473402/2011-4)

+ Corresponding author: m.l.bazzo@ufsc.br

Received 15 March 2015

Accepted 8 June 2015

# ANEXO B – Artigo “First insight into the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina, southern Brazil”.

Tuberculosis 97 (2016) 57–64



Contents lists available at ScienceDirect

Tuberculosis

journal homepage: <http://intl.elsevierhealth.com/journals/tube>



## MOLECULAR ASPECTS

### First insight into the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina, southern Brazil



Christiane Lourenço Nogueira <sup>a</sup>, Rodrigo Ivan Prim <sup>a</sup>, Simone Gonçalves Senna <sup>a</sup>,  
Darcita Büeinger Rovaris <sup>b</sup>, Rosemeri Maurici <sup>a</sup>, Maria Lúcia Rossetti <sup>c</sup>, David Couvin <sup>d</sup>,  
Nalin Rastogi <sup>d</sup>, Maria Luiza Bazzo <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Campus Universitário, s/n, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório Central Do Estado de Santa Catarina – LACEN/SC, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

<sup>c</sup> Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde Do Rio Grande Do Sul – FEPS/RS, Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brazil

<sup>d</sup> WHO Supranational TB Reference Laboratory, Institut Pasteur de la Guadeloupe, Abymes, Guadeloupe, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 5 August 2015

Received in revised form

14 December 2015

Accepted 20 December 2015

### Keywords:

Tuberculosis

Spoliotyping

Molecular epidemiology

Santa Catarina

## SUMMARY

Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* is useful for understanding disease transmission dynamics, and to establish strategic measures for TB control and prevention. The aim of this study was to analyze clinical, epidemiological and molecular characteristics of MTBC clinical isolates from Santa Catarina state, southern Brazil. During one-year period, 406 clinical isolates of MTBC were collected from Central Laboratory of Public Health and typed by spoliotyping. Demographic and clinical data were collected from the Brazilian National Mandatory Disease Reporting System. The majority of cases occurred in highest population densities regions and about 50% had some condition associated with TB. Among all isolates, 5.7% were MDR, which showed association with drug addiction. IAM was the most predominant lineage with 47.5%, followed by the T superfamily with 25.9% and Haarlem with 12.3%. The MST showed two major groups: the first was formed mainly by the IAM lineage and the second was mainly formed by the T and Haarlem lineages. Others lineages were distributed in peripheral positions. This study provides the first insight into the population structure of *M. tuberculosis* in SC State. Spoliotyping and other genotyping analyses are important to establish strategic measures for TB control and prevention.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Tuberculosis (TB), an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), is a worldwide health problem, accounting for about 1.3 million deaths per year. According to the most recent Global TB Report by WHO, Brazil is one of the 22 high burden TB countries in the world with an estimated incidence of 46/100,000 population [1]. Santa Catarina State (SC) has one of the

lowest TB incidence rates in Brazil (29.1/100,000). However, some cities like Itajaí (65.5/100,000 inhabitants) have higher than national average rates [2].

*M. tuberculosis* genotyping is useful for understanding the prevailing TB genotypes and their circulation within a certain population. The latter is important for understanding disease transmission dynamics, and to establish strategic measures for TB control and prevention. Moreover, the molecular characterization of *M. tuberculosis* in conjunction with a detailed analysis of clinical and epidemiological information is key to investigate the possible association of genotypic lineages with the clinical and epidemiological characteristics of the disease [3–5].

Since data about the molecular characterization of circulating *M. tuberculosis* strains in SC is scarce, we hereby provide a first insight into spoliotyping-based genetic diversity and the main genotypic lineages of MTBC clinical isolates circulating in SC, southern Brazil.

\* Corresponding author. Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. Tel.: +55 48 3721 8148; fax: +55 48 3721 9100.

E-mail addresses: [nogueira.chris@gmail.com](mailto:nogueira.chris@gmail.com) (C.L. Nogueira), [rodrigo.prim@posgrad.ufsc.br](mailto:rodrigo.prim@posgrad.ufsc.br) (R.I. Prim), [simonesenna@hotmail.com](mailto:simonesenna@hotmail.com) (S.G. Senna), [darcitarovaris@gmail.com](mailto:darcitarovaris@gmail.com) (D.B. Rovaris), [rosemaurici@gmail.com](mailto:rosemaurici@gmail.com) (R. Maurici), [rossetti@terra.com.br](mailto:rossetti@terra.com.br) (M.L. Rossetti), [david.couvin@pasteur.fr](mailto:david.couvin@pasteur.fr) (D. Couvin), [nrastogi@pasteur-guadeloupe.fr](mailto:nrastogi@pasteur-guadeloupe.fr) (N. Rastogi), [m.l.bazzo@ufsc.br](mailto:m.l.bazzo@ufsc.br) (M.L. Bazzo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2015.12.005>

1472-9792/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

# ANEXO C – Artigo “Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains from prison populations in Santa Catarina, Southern Brazil”.

Infection, Genetics and Evolution 58 (2018) 34–39



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)



Short communication

## Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains from prison populations in Santa Catarina, Southern Brazil



Taiana Freitas Medeiros<sup>a</sup>, Christiane Lourenço Nogueira<sup>a</sup>, Rodrigo Ivan Prim<sup>a</sup>, Mara Cristina Scheffer<sup>a</sup>, Eduardo Venâncio Alves<sup>b</sup>, Darcita Büerger Rovaris<sup>b</sup>, Thierry Zozio<sup>c</sup>, Nalin Rastogi<sup>c,\*</sup>, Maria Luiza Bazzo<sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Campus Universitário, s/n, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório Central do Estado de Santa Catarina (LACEN/SC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

<sup>c</sup> WHO Supranational TB Reference Laboratory, Institut Pasteur de la Guadeloupe, Aitymes, Guadeloupe, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Tuberculosis  
Prison  
Molecular epidemiology  
Spoligotyping  
12-MIRU  
Santa Catarina

### ABSTRACT

The Tuberculosis (TB) notification rates are 5 to 81 times higher in prisons worldwide when compared to the general population. The state of Santa Catarina (SC) has few epidemiological data regarding TB in prisons. The aim of this study was to evaluate the molecular epidemiology of circulating strains in prisons of SC. The study comprised 95 clinical samples from six prisons. Among the cases included, all subjects were male, predominantly caucasians, and young adults, with low education level. The positive smear in the TB diagnosis comprised 62.0% of cases. About 50% of subjects had some condition associated with TB. The Spoligotyping results showed that the most frequent lineages were LAM (50.7%), T (22.2%) and S (11.6%). The 12-loci MIRU generated 62 different genotypes. The MSTs showed evolutionary relationships between *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes from SC and evolutionary relationships between the prison isolates and studied parameters. This first study on TB in prison units of SC highlighted the predominance of SIT216/LAM5, and SIT34/S. Interestingly, his profile was found to be different from that observed in a previous study performed with the state's general population. This data shows the need for continued surveillance of episodes of TB occurring among prison inmates in an emerging country like Brazil.

### 1. Introduction

Tuberculosis (TB) is one of the world's deadliest infectious diseases. TB notification rates are 5 to 81 times higher in prisons worldwide when compared to the general population (WHO, 2014). In Santa Catarina (SC), Southern Brazil, the incidence rate within the prison system in 2014 was 1295/100,000 inhabitants, 25 times higher when compared to the general population (Brasil, 2014; Brasil, 2016). The SC prison system's capacity is sufficient to accommodate only 60% of the total inmate population, demonstrating the rate of overcrowding in SC prisons (Brasil, 2014). The prolonged stay in enclosed and poorly ventilated spaces, overcrowding, lack of control measures for air-transmitted diseases, and high HIV infection rates among prisoners encourage the TB transmission (Dara et al., 2015).

Molecular epidemiology studies are useful tools in the identification of factors of TB distribution and transmission among the inmates. In

this study, Spoligotyping and Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeat (MIRU-VNTR) analyses were employed to determine the frequency of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) genotypes in clinical isolates from inmates of SC prisons. The genotypes were then related to clinical and epidemiological data, and compared with non-prison TB isolates in SC to verify any prison-related specificities.

### 2. Materials and methods

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Santa Catarina under number 03448612.9.0000.0121.

Ninety five MTB clinical isolates were obtained from the Central Laboratory of Public Health of SC (LACEN-SC), from January/2010 to December/2014. Samples were collected from 95 inmates from six

\* Correspondence to: N. Rastogi, WHO Supranational TB Reference Laboratory, Tuberculosis & Mycobacteria Unit, Institut Pasteur de la Guadeloupe, Morne Jolivier, BP 484, 97183 Aitymes, Guadeloupe, France.

\*\* Correspondence to: M.L. Bazzo, Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

E-mail addresses: [rodrigo.prim@pog.md.ufsc.br](mailto:rodrigo.prim@pog.md.ufsc.br) (R.I. Prim), [tzozio@pasteur-guadeloupe.fr](mailto:tzozio@pasteur-guadeloupe.fr) (T. Zozio), [nrastogi@pasteur-guadeloupe.fr](mailto:nrastogi@pasteur-guadeloupe.fr) (N. Rastogi), [m.l.bazzo@ufsc.br](mailto:m.l.bazzo@ufsc.br) (M.L. Bazzo).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.010>

Received 7 July 2017; Received in revised form 24 November 2017; Accepted 13 December 2017

Available online 15 December 2017

1567-1348/© 2017 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

# ANEXO D – Artigo “Performance of centralized versus decentralized tuberculosis treatment services in Southern Brazil, 2006–2015”.

Scheffer et al. *BMC Public Health* (2018) 18:554  
<https://doi.org/10.1186/s12889-018-5468-8>

BMC Public Health

## RESEARCH ARTICLE

## Open Access



# Performance of centralized versus decentralized tuberculosis treatment services in Southern Brazil, 2006–2015

Mara Cristina Scheffer<sup>1</sup>, Rodrigo IVAN Prim<sup>1</sup>, Leticia Muraro Wildner<sup>1</sup>, Taiane Freitas Medeiros<sup>1</sup>, Rosemeri Maurici<sup>2</sup>, Emil Kupek<sup>3</sup> and Maria Luiza Bazzo<sup>1,4\*</sup>

### Abstract

**Background:** Tuberculosis (TB) control programs face the challenges of decreasing incidence, mortality rates, and drug resistance while increasing treatment adherence. The Brazilian TB control program recommended the decentralization of patient care as a strategy for combating the disease. This study evaluated the performance of this policy in an area with high default rates, comparing epidemiological and operational indicators between two similar municipalities.

**Methods:** This study analyzed epidemiological and operational indicators on new cases of pulmonary tuberculosis reported in the Brazilian Notifiable Diseases Information System between 2006 and 2015. In addition, to characterize differences between the populations of the two studied municipalities, a prospective cohort study was conducted between 2014 and 2015, in which patients with new cases of culture-confirmed pulmonary tuberculosis were interviewed and monitored until the disease outcome. A descriptive analysis, the chi-square test, and a Poisson regression model were employed to compare TB treatment outcomes and health care indicators between the municipalities.

**Results:** Two thousand three hundred nine cases were evaluated, of which 207 patients were interviewed. Over the 2006–2015 period, TB incidence per 100,000 population in the municipality with decentralized care was significantly higher (39%, 95% CI 27–49%) in comparison to that of the municipality with centralized care. TB treatment default rate (45%, 95% CI 12–90%) was also higher in the municipality with decentralized care. During the two-year follow-up, significant differences were found between patients in centralized care and those in decentralized care regarding treatment success (84.5 vs. 66.1%), treatment default (10.7 vs. 25.8%), illicit drug use (27.7 vs. 45.9%), and homelessness (3.6 vs. 12.9%). The operational indicators revealed that the proportion of control smear tests, medical imaging, and HIV tests were all significantly higher in the centralized care. However, a significantly higher proportion of patients started treatment in the early stages of the disease in the municipality with decentralized care.

**Conclusions:** These data showed a low success rate in TB treatment in both municipalities. Decentralization of TB care, alone, did not improve the main epidemiological and operational indicators related to disease control when compared to centralized care. Full implementation of strategies already recommended is needed to improve TB treatment success rates.

**Keywords:** Tuberculosis, Public health, Treatment outcome, Decentralized

\* Correspondence: [m.l.bazzo@ufsc.br](mailto:m.l.bazzo@ufsc.br)

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas for Programa de Pós-Graduação em Farmácia da, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Sorologia e Micobactérias, Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Campos Universitário- Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.