



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

O LABORATÓRIO COMO SUPORTE PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE

Ana Júlia Reis

Rio Grande, 2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

O LABORATÓRIO COMO SUPORTE PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE

Ana Júlia Reis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Ivy Bastos Ramis

Rio Grande, 2017

Ana Júlia Reis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

O LABORATÓRIO COMO SUPORTE PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Daniela Fernandes Ramos – FURG

Prof(a). Dr(a). Andrea von Groll - FURG

Prof(a). Dr(a). Lia Gonçalves Possuelo – Externo

Prof(a). Dr(a). Andréia Rosane de Moura Valim - Externo

Prof. Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva – FURG (Orientador)

Prof(a). Dr(a). Ivy Bastos Ramis – FURG (Co-orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais pela dedicação de ambos na formação de meu caráter e pelo apoio incondicional em todos os momentos, especialmente durante o período de mestrado, em que muitas mudanças ocorreram. Ao meu irmão e outros familiares, pelo auxílio e carinho prestado em todos os momentos difíceis.

Aos velhos e bons amigos, por entenderem muitas vezes as minhas ausências, por me apoiarem e acreditarem em mim. Aos amigos que fiz durante o mestrado, que sem dúvida foram fundamentais para minha adaptação a uma nova cidade e a uma nova rotina. Todos vocês são muito especiais para mim!

Ao meu orientador Prof. Pedro E. A. Silva, que acreditou no meu potencial e me incentivou a estudar e aproveitar todas as oportunidades sempre, a minha co-orientadora Prof. Ivy B. Ramis, que me auxiliou em muitos momentos para a construção deste trabalho. Durante estes 15 meses de mestrado, aprendi muito com vocês. Agradeço por seus ensinamentos, disponibilidade, exigência, dedicação e paciência.

Além disto, agradeço a todos os colegas e professores do Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica (NUPEMM), que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada pelo apoio, amizade, orientação e ensinamentos prestados.

Agradeço a toda a banca pela disponibilidade de participação. Em especial para as professoras Andréia R. M. Valim e Lia Possuelo, que desde a graduação me incentivam e me apoiam na vida acadêmica, sendo grandes exemplos para mim.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação. A elaboração da mesma não teria sido possível sem a colaboração e estímulo de tantas pessoas.

A todos vocês, muito obrigada!

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes forem necessárias. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.”

Bill Gates

RESUMO

Nos últimos anos diferentes metodologias para o diagnóstico da tuberculose (TB) foram desenvolvidas. Entretanto, a implantação destas novas ferramentas, deve ser criteriosamente avaliada quanto ao seu impacto relacionado a acurácia e custo-benefício. Neste sentido, o estudo teve como objetivo geral avaliar o laboratório como suporte para o controle da TB. Realizou-se um estudo transversal, incluindo todas as amostras pulmonares e extrapulmonares recebidas, no laboratório de Micobactérias do Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, do Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr, em Rio Grande/RS, Brasil, no período de abril de 2015 a abril de 2016. Para a comparação de métodos diagnósticos, foram avaliados a microscopia de Ziehl Neelsen (ZN), microscopia de Auramina O (AO), cultura líquida em BACTEC MGIT® (*BD - Becton, Dickinson and Company*) e Teste Molecular Rápido (TMR). Como padrão-ouro para detecção do *M. tuberculosis*, foram utilizados os métodos cultura líquida, com confirmação molecular do Complexo *M. tuberculosis* pela identificação da presença da IS-6110, e/ou TMR. Todos os pacientes com amostras positivas pela cultura líquida e com confirmação por IS-6110, tiveram uma de suas amostras genotipada pelo MIRU-VNTR 15 *loci* e foram testadas frente a isoniazida, rifampicina, etambutol e estreptomicina. No período de estudo foram recebidas 778 amostras clínicas, oriundas de 423 pacientes. Do total de pacientes, 88,9% (376/423) foram incluídos na comparação de métodos diagnósticos, sendo 20% (75/376) positivos para TB. A prevalência de coinfeção TB/HIV entre os pacientes foi de 54,7% (41/75). Verificou-se que o TMR apresentou melhores resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia, seguido pelos métodos cultura líquida, microscopia de AO e microscopia de ZN. Para a genotipagem e teste de sensibilidade, foram obtidas amostras de 71 pacientes, sendo que 4,2% (3/71) foram excluídos por não apresentarem crescimento após repique em meio de cultura Ogawa-Kudoh. Entre os 95,8% (68/71) dos isolados incluídos, 58,8% (40/68) foram agrupados em 8 clusters. Nos quatro maiores clusters, 90,6% dos pacientes coincidiram as datas de consultas, realização de exames e internações no hospital. Isto sugere uma possível transmissão nosocomial de *M. tuberculosis*. Dentre os isolados avaliados no teste de sensibilidade aos antimicrobianos, 11,8% (8/68) foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados, sendo 37,5% (3/8) agrupadas em um mesmo cluster. O TMR é uma ferramenta promissora no diagnóstico da TB, com alta especificidade e sensibilidade, além de possuir vantagens relacionadas ao tempo de detecção e a capacidade de identificar resistência a RIF. Além disto, neste estudo foi possível verificar a ocorrência de possível transmissão nosocomial entre pacientes com TB, inclusive de cepas resistentes aos antimicrobianos. Neste sentido, o estabelecimento de medidas de controle de infecção, com a participação efetiva do laboratório no diagnóstico precoce e na realização de teste rápido para determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, para que posteriormente ocorra a implementação de esquemas terapêuticos eficazes, são elementos cruciais para evitar a disseminação do *M. tuberculosis* em estabelecimentos de saúde, especialmente aqueles com alta carga da doença.

Palavras-chave: Tuberculose; Métodos diagnósticos; Genotipagem; Antimicrobianos.

ABSTRACT

In the last years various methodologies for the diagnosis and control of tuberculosis (TB) have been developed. However, the development of these new tools, should be carefully evaluated as to their impact related to accuracy and cost-effectiveness. The aim of this study was to evaluate the laboratory as support for TB control, in a mycobacteriology laboratory in the City of Rio Grande. A cross-sectional study was performed, including all pulmonary and extrapulmonary samples received at the Mycobacteria Laboratory of Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa JR, at Rio Grande/RS, Brazil, in the period from April 2015 to April 2016. For the comparison of diagnosis methods, were evaluated microscopy with Ziehl Neelsen (ZN) staining, microscopy with Auramine O (AO) staining, liquid culture on BACTEC MGIT[®] (BD - Becton, Dickinson and Company) and Rapid Molecular Test (RMT). As the gold standard for detection of TB cases, we used the methods liquid culture, with molecular confirmation of *M. tuberculosis* complex by identifying the presence of IS-6110, and/or RMT. All patients with positive samples by liquid culture and with confirmation by IS-6110, had one of their samples genotyped by MIRU-VNTR loci 15 and were tested in front of isoniazid, rifampin, ethambutol and streptomycin. During the study period were received 778 clinical samples of 423 patients. In the total number of patients, 88.9% (376/423) were included in the comparison of diagnostic methods, being 20% (75/376) were positive for TB. The prevalence of TB/HIV coinfection among patients was 54.7% (41/75). It was found that the RMT showed better results for sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy, followed by methods liquid culture, microscopy of ZN and microscopy of AO. For genotyping and susceptibility testing, were obtained samples from 71 patients, 4.2% (3/71) were excluded, because it had not growth after inoculated in culture medium Ogawa-Kudoh. Among the 95.8% (68/71) of patients included, 58.8% (40/68) were grouped into 8 clusters. In the four major clusters, 90.6% of patients had similar dates of consultations, achievement of exams and admissions to hospital. This suggests a possible nosocomial transmission of *M. tuberculosis*. Among the isolates evaluated in the test of antimicrobial susceptibility, 11.8% (8/68) were resistant to at least one of the antimicrobials tested, being 37.5% (3/8) grouped in the same cluster. The RMT is a promising tool in the diagnosis of TB, with high specificity and sensitivity, in addition to possessing advantages related to the time of detection and the ability to identify resistance to RIF. Furthermore, in this study it was possible to verify the occurrence of possible nosocomial transmission among patients with TB, including strains resistant to drugs. In this sense, the establishment of infection control measures, with the effective participation of the laboratory in early diagnosis and rapid test for determination of the profile of antimicrobial susceptibility, so that subsequently takes place the implementation of therapeutic regimens are effective, are crucial elements to prevent the dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* in health establishments, especially those with high disease burden.

Keywords: Tuberculosis; Diagnostic methods; Genotyping; Antimicrobials.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Marcadores de taxas de incidência, coinfecção TB/HIV, abandono e cura. 16

Lista de abreviaturas e siglas

AO	Auramina
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DR	<i>Direct repeat</i> (Repetições diretas)
EMB	Etambutol
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
INH	Isoniazida
LAMP	<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i> (Amplificação Isotérmica mediada por Loop)
MDR-TB	Tuberculose multidroga resistente
MIRU-VNTR	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeat</i> (Unidades repetidas interespaçadas de Micobacteria – Número Variável de Repetições em Tandem)
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RT	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
PZA	Pirazinamida
REMA	<i>Resazurin Microtitre Assay</i> (Ensaio de microtitulação com resazurina)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição)
RIF	Rifampicina
RR-TB	Tuberculose rifampicina resistente
RS	Rio Grande do Sul
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleotídeo único)
STR	Estreptomicina
TB	Tuberculose

TMR	Teste molecular rápido
UV	Ultravioleta
XDR-TB	TB extensivamente droga resistente
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
ZN	Ziehl Neelsen

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> e a tuberculose.....	14
2.2	Epidemiologia da tuberculose	15
2.3	TB/HIV.....	17
2.4	Diagnóstico da tuberculose	18
2.5	Tratamento.....	20
2.6	Resistência aos antimicrobianos.....	21
2.7	Epidemiologia molecular	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	Geral	25
3.2	Específicos	25
	BIBLIOGRAFIA	26
4	ARTIGOS PRONTOS PARA PUBLICAÇÃO	32
4.1	Primeiro artigo.....	32
4.2	Segundo artigo	46
5	CONCLUSÕES	65
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
	ANEXOS	67
	ANEXO A: Parecer do Comitê de Ética – FURG.	67

1 INTRODUÇÃO

O *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente etiológico da tuberculose (TB), é transmitido principalmente através das vias respiratórias por aerossóis de indivíduos portadores de TB ativa (COUTINHO et al., 2012). A TB apresenta-se como uma das doenças infecciosas mais prevalentes em todo o mundo, além disso a TB multidroga resistente (MDR-TB) e a TB extensivamente droga resistente (XDR-TB), aumentam a dificuldade para o controle da doença (WHO, 2016a). Algumas populações apresentam maior vulnerabilidade para o desenvolvimento da TB, como é o caso dos pacientes HIV/AIDS. Isto é preocupante se considerarmos a estimativa de que um terço da população vivendo com o HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) também está coinfectedada com o *M. tuberculosis* (WHO, 2016a).

Considerando-se as altas taxas de prevalência da TB no mundo e no Brasil, ressalta-se que o município de Rio Grande, localizado no sul do Brasil, está entre os 181 municípios brasileiros e entre os 15 municípios do RS, prioritários para o controle da TB, apresentando incidência superior a média nacional. Além disto, é um município com baixas taxas de cura da doença e altas taxas de abandono (CEVS, 2016; SINAN, 2017). Neste sentido, são necessárias técnicas que possibilitem um rápido e acurado diagnóstico da enfermidade, permitindo o imediato estabelecimento do tratamento, a fim de reduzir a morbi-mortalidade da doença e interromper a cadeia de transmissão do bacilo (HELB et al., 2010; SAEED et al., 2012).

Técnicas diagnósticas acuradas, rápidas e que permitam a identificação de resistência aos antimicrobianos, são de extrema importância para melhorar o controle da TB, monitorar o tratamento e reduzir taxas de resistência aos antimicrobianos (STEINGART et al., 2014). Além disto, a utilização de genotipagem para o *M. tuberculosis* permite a investigação de surtos, e o rastreamento de padrões de transmissão em populações (CAFRUNE, 2009; KUHLEIS et al., 2012; COSTA et al., 2013; VALENÇA et al., 2015).

Apesar de grandes esforços no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos para TB, a detecção precoce se mantém como um desafio para o controle da doença. Neste sentido, estudos que visam o desenvolvimento, implementação e avaliação de novos métodos laboratoriais são importantes como forma de sustentar as decisões sobre quais métodos devem ser postos em uso em cada cenário.

1 Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o laboratório como
2 suporte para o controle da TB, em um Laboratório de Micobactérias do Município de
3 Rio Grande. Além disto, avaliar o desempenho do Teste Molecular Rápido (TMR) em
4 relação a outros três métodos laboratoriais utilizados rotineiramente no diagnóstico
5 da TB, caracterizar o perfil de resistência aos antimicrobianos e realizar a
6 genotipagem de cepas de *M. tuberculosis*. Os resultados obtidos deram origem a
7 dois manuscritos que serão submetidos para revistas científicas na área.

8 Espera-se que os resultados deste trabalho possam colaborar para a
9 ampliação do conhecimento na área de diagnóstico e controle da TB,
10 particularmente nas questões da transmissão do bacilo e níveis de resistência aos
11 antimicrobianos, com foco principal em ambientes hospitalares.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Mycobacterium tuberculosis* e a tuberculose

A TB é uma doença provocada principalmente pelo *M. tuberculosis*, mas também pode ser causada por outras micobactérias de crescimento lento pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) (TSUKAMURA; MIZUNO; TOYAMA, 1985; DUCATI et al., 2006; JAGIELSKI et al., 2016). O *M. tuberculosis* possui como principais características o fato de ser um bacilo álcool ácido-resistente (BAAR), aeróbio e intracelular obrigatório, com parede celular complexa, rica em lipídeos, o que lhe confere resistência à dessecação e a agentes químicos, contribuindo para a sobrevivência do bacilo dentro dos macrófagos (DUCATI et al., 2006; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A TB é uma doença antiga e que se mantém como um grande problema de saúde pública, atingindo milhões de pessoas em todo o mundo (ZUMLA et al., 2013). Apesar de ser uma doença que, com diagnóstico e tratamento eficaz, têm cura, em 2015, foi uma das dez principais causas de morte no mundo por doenças infecciosas, superando o número de mortes causadas pelo HIV (WHO, 2016a).

A transmissão do *M. tuberculosis* tem sido diretamente associada aos cuidados de saúde, sendo a TB descrita como um grave problema em ambientes hospitalares, locais onde surtos da doença são frequentemente documentados (GANDHI et al., 2013; HARRIS; MEISSNER; PROOPS, 2013; JONSSON et al., 2013; MILLER et al., 2015). Isto se dá, em parte, pelo fato de ser um ambiente com diferentes grupos de pacientes, que possuem fatores de risco para o desenvolvimento da doença, como por exemplo, tratamento prévio para TB e HIV (WHO, 2013).

O *M. tuberculosis* é transmitido geralmente através de vias aéreas, por intermédio da inalação de partículas com o bacilo que são expelidas pela tosse, fala ou espirro do paciente com TB pulmonar ativa. Pacientes bacilíferos, ou seja, que apresentam baciloscopia positiva, são os principais transmissores do bacilo (BRASIL, 2007; BRASIL, 2011). As manifestações clínicas mais comuns da TB pulmonar incluem tosse por duas ou mais semanas, dor torácica, perda de apetite, emagrecimento, febre, sudorese noturna, cansaço e hemoptise (LAWN; ZUMLA, 2011; SIA et al., 2011).

1 Cerca de 90% dos casos de TB são de origem pulmonar, sendo esta a
2 principal fonte de manutenção da cadeia de transmissão do bacilo. A forma
3 extrapulmonar, que acomete outros órgãos como pleura, gânglios, ossos e sistema
4 urinário, atinge em torno de 10% dos pacientes (BRASIL, 2011).

5 Existe ainda, a forma latente da TB, que acomete cerca de um terço da
6 população mundial e que ocorre quando o bacilo entra em fase de latência, e
7 consiste num importante reservatório do bacilo, possibilitando o desenvolvimento da
8 doença em algum momento da vida. Estima-se que 5% destes pacientes irão
9 desenvolver a doença ativa durante sua vida (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007;
10 ANDREWS et al., 2012; WHO, 2016a). Além disto, alguns fatores contribuem para
11 uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento da TB, dentre eles, as infecções
12 pelo HIV, as doenças hematológicas e reticuloendoteliais, as medicações
13 imunossupressoras, a diabetes mellitus, a doença renal crônica, a desnutrição
14 grave, entre outros (JENSEN et al., 2005).

16 **2.2 Epidemiologia da tuberculose**

18 A parceria STOP TB para o fim da TB, estabelecida em 2001 pela
19 Organização Mundial da Saúde (OMS), adotou como um de seus principais objetivos
20 a redução das taxas de prevalência e de mortalidade por TB pela metade, até 2015.
21 Esta redução foi alcançada em 16 dos 22 países considerados de alta carga da
22 doença, entre 2002 e 2015. Globalmente, a taxa de mortalidade por TB teve uma
23 diminuição de 47% e a taxa de prevalência da doença reduziu 42%, entre 1990 e
24 2015 (WHO, 2016a).

25 Hoje, a estratégia END TB, adotada pela Assembléia Mundial de Saúde de
26 2014, objetiva uma redução de 90% nos óbitos e de 80% na incidência da doença
27 até 2030, em comparação com 2015. Isso define uma prevalência média esperada,
28 de 10/100.000 habitantes, taxa encontrada em países de baixa carga da doença
29 (WHO, 2016a).

30 Em 2015, foram registrados 10,4 milhões de novos casos de TB no mundo,
31 dos quais 5,9 milhões entre homens, 3,5 milhões entre mulheres e 1,0 milhão entre
32 crianças. Além disto, 1,8 milhões de pessoas morreram da doença, sendo 400 mil
33 resultantes da coinfeção TB/HIV. Mais de 95% das mortes por TB ocorrem em
34 países de baixa e média renda (WHO, 2016a; WHO, 2017).

1 Segundo a OMS, o Brasil ocupa a 20ª colocação entre os 30 países que
2 abrangem 87% de todos os casos de TB no mundo. No ano de 2015, foram
3 notificados cerca de 84 mil novos casos, representando uma incidência de
4 41/100.000 habitantes. Além disto, a taxa de coinfeção TB/HIV foi de 9,7%. O
5 número de mortes causadas pela TB no mesmo ano chegou a 7.700, sendo 2.200
6 entre pacientes HIV positivos. Além disto, no ano de 2014, a taxa de cura foi de 71%
7 e a taxa de abandono foi de 11% (Tabela 1) (WHO, 2016a).

8 No Rio Grande do Sul (RS), em 2015, a incidência de TB foi de 42,9/100.000
9 habitantes, sendo 23,8% entre pacientes HIV positivos (IBGE, 2017; SINAN, 2017).
10 Como grande preocupação, têm-se o fato de que as taxas de cura da TB no RS se
11 mantêm como uma das mais baixas do país, sendo em 2014, de 63,7%, além disto
12 as taxas de abandono se mantêm em torno de 15,1% (BRASIL, 2011; CEVS, 2016).
13 O estado possui 15 municípios prioritários para o controle da doença, sendo estes
14 responsáveis por 64% dos casos notificados e por 80% dos casos de abandono
15 (Tabela 1) (BRASIL, 2014; CEVS, 2016).

16 O município de Rio Grande, localizado na região sul do RS, está entre os 181
17 municípios brasileiros e entre os 15 municípios do RS prioritários para o controle da
18 TB. Em 2015, a incidência de TB no município foi de 70,5/100.000 habitantes e a
19 taxa de coinfeção TB/HIV atingiu 29,6% (IBGE, 2017; SINAN, 2017). No mesmo
20 ano, a taxa de cura foi de 57,5% e a de abandono, 24,1%, sendo a maior do estado.
21 Deve-se considerar que as taxas de cura e de abandono preconizadas pelo
22 ministério da saúde, são de 85% e 5%, respectivamente (Tabela 1) (CEVS, 2016;
23 WHO, 2016a).

24
25 **Tabela 1: Marcadores de taxas de incidência, coinfeção TB/HIV, abandono e**
26 **cura.**

	Incidência (100.000 habitantes)	Coinfeção TB/HIV (%)	Taxa de cura (%)	Taxa de abandono (%)
Brasil	41	9,7	71	11
RS	42,9	23,8	63,7	15,1
RG	70,5	29,6	57,5	24,1

27 Fonte: CEVS, 2016; BRASIL, 2016, SINAN, 2017

2.3 TB/HIV

A infecção pelo *M. tuberculosis* em pacientes HIV positivos é uma pandemia emergente, sendo a principal causa de morte entre pessoas infectadas com o vírus HIV (PAWLOWSKI et al., 2012; WHO, 2016a). A infecção pelo HIV apresenta associação direta com a progressão da TB, tanto em infecções primárias, quanto em reativações de infecção latente e em reinfecções (WHALEN et al., 2011). Os pacientes infectados pelo HIV têm de 20 a 40 vezes maior risco de desenvolvimento de TB ativa (BRASIL, 2013; WHO, 2016a). Ademais, estima-se que uma em cada dez pessoas com HIV e com TB latente poderá desenvolver a doença a cada ano, o que se relaciona diretamente com a resposta imunológica deficiente destes pacientes (MAARTENS; WILKINSON, 2007). Disso resulta a importância em determinar a prevalência de HIV entre pacientes com TB, para que seja realizado o manejo adequado de ambas as infecções (WHO, 2010; ZUMLA et al., 2013).

Em dezembro de 2013, a Junta de Coordenação de Programa (PCB) junto com o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS) estabeleceram a meta 90-90-90, com o objetivo de intensificar o tratamento do HIV a partir de 2015. As metas estabelecidas foram que até 2020, 90% de todas as pessoas vivendo com HIV saberão que têm o vírus, 90% de todas as pessoas com infecção pelo HIV diagnosticada receberão terapia antirretroviral e 90% de todas as pessoas recebendo terapia antirretroviral terão supressão viral (UNAIDS, 2015).

Neste sentido, a investigação para TB deve ser realizada em todas as consultas dos pacientes HIV positivos (BRASIL, 2013). Visto que, a infecção pelo HIV é associada com uma apresentação clínica diferente, que inclui grande frequência de baciloscopia negativa, radiografia de tórax normal e maior frequência de TB extrapulmonar, gerando maiores desafios para o diagnóstico, principalmente em países de baixa renda (AARON et al., 2004; CDC, 2012; VITTOR; GARLAND; GILMAN, 2014).

Em 2015, o percentual de pacientes com TB e status conhecido de HIV, entre os 30 países com maior carga da doença, foi em média 64%. Globalmente, 15% dos pacientes portadores de TB são HIV positivos. No ano de 2014, a taxa de sucesso no tratamento para pacientes HIV positivos foi de 75%, enquanto para HIV negativos foi de 83% (WHO, 2016a). No Brasil, em 2015, a taxa de coinfeção TB/HIV foi de

1 9,7%, sendo 17,3% na região sul do Brasil, 23,8% no RS e 29,6% no município de
2 Rio Grande (SINAN, 2017).

3

4 **2.4 Diagnóstico da tuberculose**

5

6 Um dos maiores obstáculos no controle da TB é a rápida e acurada detecção
7 dos doentes (WHO, 2016a). Melhorias na detecção de casos de TB, incluindo
8 aqueles negativos na baciloscopia, muitas vezes relacionados com a coinfeção
9 pelo HIV, bem como aqueles com cepas resistentes aos antimicrobianos, são
10 prioridades globais para o controle da doença (WHO, 2014). A estratégia para o fim
11 da TB requer que a letalidade caia para 10% em 2020 e 6,5% em 2025. No entanto,
12 isto só será possível se todos os pacientes com TB forem diagnosticados
13 rapidamente e tratados eficazmente (WHO, 2016a).

14 Estima-se que anualmente, aproximadamente, três milhões de pacientes não
15 sejam diagnosticados e tratados, o que corresponde a um terço de todos os casos
16 de TB (WHO, 2016a). Com o aumento no número de novos casos de resistência aos
17 antimicrobianos, bem como com as limitações das técnicas diagnósticas atuais,
18 destaca-se a urgência de métodos diagnósticos rápidos e eficazes de triagem,
19 disponíveis para locais com recursos limitados, a fim de aprimorar o diagnóstico
20 precoce da doença (ZUMLA et al., 2013; WHO, 2014; DIRLIKOV; RAVIGLIONE;
21 SCANO, 2015).

22 O diagnóstico clínico da TB se baseia na sintomatologia do paciente e na
23 realização da radiografia de tórax, no entanto, estes apresentam baixa
24 especificidade, podendo levar a falsos diagnósticos e tratamentos desnecessários.
25 Desta forma, é fundamental que o diagnóstico laboratorial seja realizado para
26 confirmar a doença, garantindo o estabelecimento do tratamento adequado (WHO,
27 2016a).

28 Dentre os métodos laboratoriais empregados no diagnóstico da TB, a
29 baciloscopia é o mais utilizado, estando disponível na maioria dos laboratórios,
30 incluindo aqueles com poucos recursos físicos e/ou financeiros (STEINGART et al.,
31 2006; WHO, 2011a). Por ser uma técnica de execução simples, rápida e de baixo
32 custo, o limitante desta metodologia é sua baixa sensibilidade. Especialmente em
33 amostras paucibacilares (WHO, 2011a; WHO, 2016a). A maioria dos laboratórios
34 utiliza a microscopia ótica, com coloração por Ziehl Neelsen (ZN), que tem alta

1 especificidade, no entanto sua sensibilidade pode variar de 20 a 80% (WHO, 2011b).
2 A microscopia de fluorescência, com coloração de Auramina O (AO), é cerca de 10%
3 mais sensível que o ZN e leva menos tempo, contudo tem maior custo, necessitando
4 de microscópio de fluorescência (WHO, 2011b).

5 O cultivo continua sendo considerado o padrão-ouro para o diagnóstico,
6 além de ser a precursor para testes de sensibilidade aos antimicrobianos. É um
7 método que necessita de instalações laboratoriais com alta segurança biológica e
8 requer um maior tempo de execução, no entanto, é mais específico e sensível que a
9 microscopia (SILVA et al., 2007; HONSCHA et al., 2008; CHIHOTA et al., 2010;
10 NAKIYINGI; NANKABIRWA; LAMORDE, 2013; WHO, 2014; IRAM et al., 2015;
11 BRUM et al., 2016). A cultura em meio sólido necessita de 4 a 8 semanas para o
12 crescimento bacteriano obtenção dos resultados. A cultura em meio líquido, embora
13 mais propensa a contaminações, é mais sensível e também mais rápida,
14 necessitando de 7 a 14 dias para o diagnóstico (STEINGART et al., 2014; BRUM et
15 al., 2016). A cultura líquida, realizada em BACTEC MGIT[®] 320 (BD - Becton,
16 Dickinson and Company), é constituída de um composto fluorescente, embebido em
17 silicone, sensível à presença do oxigênio no meio. Inicialmente, a grande quantidade
18 de oxigênio no meio, extingue as emissões do composto e conseqüentemente pouca
19 fluorescência é detectada. Posteriormente, com a multiplicação bacteriana, o sensor
20 de fluorescência é ativado devido à depleção de oxigênio no meio de cultura,
21 ocasionando a emissão de fluorescência e a sua detecção pelo equipamento
22 (RIVERA et al., 1997).

23 Nos últimos anos, diversos métodos laboratoriais para o diagnóstico rápido da
24 TB, bem como para a detecção de resistência aos fármacos têm sido desenvolvidos.
25 Testes moleculares baseados na técnica de reação em cadeia da polimerase em
26 tempo real (PCR-RT) têm sido utilizados, principalmente devido a sua rapidez e
27 baixo risco de contaminação. Dentre os métodos moleculares, têm-se o TMR, que
28 além de detectar, diretamente da amostra clínica, bactérias do CMTB, é capaz de
29 detectar resistência a rifampicina (RIF), com sensibilidade de 95% (BLAKEMORE et
30 al., 2010; HELB et al., 2010; HILLEMANN et al., 2011; MEYER-RATH et al., 2012;
31 CEPHEID, 2015; MUTINGWENDE et al., 2015; BAJRAMI et al., 2016).

32 O TMR tem sido indicado como um possível substituto para a baciloscopia.
33 É um método inovador e promissor para a rotina diagnóstica da TB, devido a sua
34 alta sensibilidade, especificidade e rapidez. Através deste método obtêm-se os

1 resultados em um período de duas horas, o que reflete diretamente na redução da
2 morbimortalidade pela doença, principalmente em pacientes com baciloscopia
3 negativa (LAWN et al., 2011; WHO, 2014). O TMR é capaz de detectar em torno de
4 131 bacilos por mL de amostra (HELB et al., 2010), enquanto a microscopia
5 necessita de pelo menos 10.000 bacilos por mL (WHO, 2004). Na cultura líquida em
6 BACTEC MGIT, no momento da positividade do tubo, existem cerca de 10⁴ a 10⁷
7 UFC/ml de micobactérias presentes (BD, 2001). Além disso, é um teste que pode ser
8 aplicado tanto para amostras pulmonares como para extrapulmonares (HILLEMANN
9 et al., 2011; STEINGART et al., 2014). No entanto, apresenta como limitações, a
10 identificação tanto de bactérias viáveis quanto não viáveis, a não detecção de
11 resistência à isoniazida (INH) e o elevado custo (MIOTTO et al., 2012).

12 Além do TMR, outros métodos também estão sendo desenvolvidos para o
13 diagnóstico da TB. Dentre estes está a técnica de *Loop-mediated Isothermal*
14 *Amplification* (LAMP), que se baseia na realização de uma reação em cadeia da
15 polimerase (PCR) alternativa, sem necessidade de oscilações de temperaturas e do
16 uso de termociclador. Possui a capacidade de detectar polimorfismo de nucleotídeo
17 único (*Single nucleotide polymorphism* - SNP), tornando-se uma técnica com alta
18 sensibilidade e especificidade. Devido a grande sensibilidade e o alto poder de
19 amplificação, a análise de resultados pode ser realizada visualmente, através da
20 turbidez ou da fluorescência, utilizando corantes que se intercalam com o DNA
21 (IWAMOTO; SONOBE; HAYASHI, 2003; BI et al., 2012; WHO, 2016b).

22

23 **2.5 Tratamento**

24

25 Os fármacos com atividade antimicobacteriana foram introduzidos ao
26 tratamento da TB em meados do século passado, sendo estes capazes de curar
27 quase todos os casos de TB causados por cepas sensíveis aos antimicrobianos. No
28 entanto, algumas limitações como, a longa duração do tratamento, a combinação de
29 quatro fármacos, a ocorrência de interações medicamentosas e os efeitos colaterais,
30 podem determinar que os pacientes interrompam o tratamento, ocasionando falhas,
31 resistência adquirida e conseqüente ineficácia dos antimicrobianos (PALOMINO;
32 RAMOS; SILVA, 2009; ARBEX et al., 2010). Todas estas limitações enfatizam a
33 necessidade de desenvolver novas abordagens terapêuticas que sejam mais ativas

1 e menos tóxicas, a fim de melhorar o tratamento da TB (PALOMINO; RAMOS;
2 SILVA, 2009).

3 No Brasil, o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde compreende a
4 utilização de quatro antimicrobianos em um único comprimido: RIF, INH,
5 pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB) por dois meses e, numa segunda fase, INH e
6 RIF por mais quatro meses. Além disto, o uso isolado de INH é o pilar da terapia de
7 profilaxia da TB (BRASIL, 2011). Para os casos de MDR-TB e XDR-TB, é necessária
8 a administração de fármacos de segunda linha como canamicina, capreomicina,
9 levofloxacina, terizidona, claritromicina, linezolida, dentre outros (WHO, 2008). O
10 tratamento para MDR-TB e XDR-TB é mais longo, mais dispendioso e com mais
11 efeitos colaterais (JAWAHAR, 2004; WHO, 2016a).

12 Globalmente, a cobertura do tratamento da TB foi de 59% em 2015, de 54%
13 em 2010 e 36% em 2000. Entre os 30 países com alta carga de TB, os níveis mais
14 altos de cobertura de tratamento em 2015 (> 80%) foram no Brasil, China, Filipinas e
15 na Rússia (WHO, 2016a). No Brasil, em 2014, 74,2% dos casos novos de TB
16 pulmonar obtiveram cura após o tratamento. No entanto, a proporção de abandono
17 no Brasil ainda é alta, chegando a 11,0%, quando o preconizado é de até 5,0%
18 (BRASIL, 2016).

19

20 **2.6 Resistência aos antimicrobianos**

21

22 No final de 1940 ocorreram os primeiros relatos de resistência a
23 antibióticoterapia para TB (CROFTON; MITCHISON, 1948). Atualmente a TB
24 resistente representa uma ameaça para o controle da doença em todo o mundo.
25 Cepas resistentes de *M. tuberculosis* resultam principalmente de mutações
26 espontâneas e de pressão seletiva, causadas pelo uso indevido dos antimicrobianos
27 (ALIA et al., 2014).

28 A porcentagem média de casos de MDR-TB com XDR-TB, em 2015, foi de
29 9,5%. (WHO, 2016a). Neste mesmo ano, foram estimados 580.000 novos casos de
30 MDR-TB, sendo 100.000 de TB resistente a rifampicina (RR-TB) (Figura 2). Em Maio
31 de 2016, a OMS emitiu orientações para que todos os pacientes com RR-TB, com
32 ou sem resistência a outros antimicrobianos, fossem elegíveis para o tratamento
33 com antimicrobianos de segunda linha (WHO, 2016a).

1 As altas taxas de resistência aos antimicrobianos são diretamente
2 relacionadas a necessidade de maior tempo de tratamento, utilização de regimes
3 medicamentosos mais tóxicos e maior dificuldade de cura, representando um
4 desafio para programas de controle da doença (ZIGNOL et al., 2012). Sem a
5 disponibilidade de melhores ferramentas de diagnóstico para RR-TB, MDR-TB e
6 XDR-TB, a transmissão não é interrompida, mantendo-se os altos níveis de
7 mortalidade pela doença (MUTINGWENDE et al., 2015). Neste sentido, o acesso
8 universal ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos é indicado, devendo ser
9 garantido pelo menos para RIF em todos os casos de TB. Hoje, a tecnologia mais
10 utilizada para a detecção de resistência é o TMR, que é capaz de detectar RR-TB
11 (WHO, 2016a).

12 Atualmente diferentes métodos são utilizados para a realização do teste de
13 sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de *M. tuberculosis*. Entretanto, nenhum
14 satisfaz todas as exigências necessárias para um teste ideal: ser rápido, barato e de
15 fácil execução (WHO, 2011c). Dentre os métodos comumente utilizados estão:
16 *Resazurin microtiter assay* (REMA), a Nitratase, BACTEC MGIT 960 SIRE e o TMR.

17 O REMA consiste em uma microdiluição seriada em placas contendo 96
18 poços, utilizando resazurina 0,02% como indicador de viabilidade celular através de
19 uma reação de oxi-redução (PALOMINO et al., 2002). Já a Nitratase, é um método
20 colorimétrico que baseia-se na capacidade de *M. tuberculosis* reduzir nitrato a nitrito,
21 sendo a revelação realizada com uma solução contendo ácido clorídrico
22 concentrado, sulfanilamida e N-1-naftil-etilenodiamina (SYRE et al., 2003). O
23 BACTEC MGIT 960 SIRE é um kit comercial, para determinação de resistência aos
24 antimicrobianos INH, RIF, EMB e estreptomicina (STR), que utiliza meio de cultura
25 específico com concentrações críticas de antimicrobianos, evitando falsos perfis de
26 sensibilidade (BD, 2002).

27 Além das técnicas descritas acima, métodos moleculares para a detecção
28 rápida de resistência aos antimicrobianos têm surgido, no entanto requerem maiores
29 custos, equipamentos e pessoal qualificado. O TMR é um exemplo de método
30 molecular, capaz de detectar mutações no gene *rpoB*, que possui uma sequência de
31 81 pares de bases (pb), e é responsável por grande parte dos casos de resistência a
32 RIF (WHO, 2014).

1 2.7 Epidemiologia molecular

2

3 A epidemiologia molecular surge a partir de uma combinação da genotipagem
4 com as abordagens epidemiológicas, tornando-se um recurso importante na
5 epidemiologia da TB (JAGIELSKI et al., 2016). Ao longo das últimas décadas, a
6 aplicação de métodos moleculares tem proporcionado um significativo avanço no
7 conhecimento da transmissão e da patogênese da TB. A epidemiologia molecular
8 permite a investigação de surtos, identificação de casos de transmissão recente,
9 discriminação entre reinfecção exógena e endógena, identificação de infecções
10 mistas, rastreamento de padrões de transmissão em populações específicas,
11 incluindo padrões de transmissão de resistência (WALKER et al., 2013; NIEMANN;
12 SUPPLY, 2014; JAGIELSKI et al., 2016).

13 Para a implementação de estratégias eficazes de controle da TB, é importante
14 unir informações da epidemiologia clássica e molecular com os dados clínicos dos
15 pacientes (CANNAS et al., 2016). Uma das primeiras técnicas amplamente utilizadas
16 para epidemiologia molecular de *M. tuberculosis*, o *Restriction Fragment Length*
17 *Polymorphism* (RFLP), baseia-se na detecção de variações geradas pelo elemento
18 de inserção IS-6110, uma região conservada no *M. tuberculosis*. Este é um
19 elemento genético móvel de micobactérias do CMTB, que apresenta uma sequência
20 altamente conservada, podendo ser encontrada em várias cópias ao longo do
21 genoma (VAN EMBDEN et al., 1993). Durante alguns anos, foi considerada a
22 técnica padrão-ouro para genotipagem de *M. tuberculosis*, no entanto, é trabalhosa,
23 demorada e com difícil interpretação (PEREIRA et al., 2013).

24 Atualmente, o método padrão-ouro de genotipagem de *M. tuberculosis* é o
25 *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats*
26 (MIRU-VNTR) (SUPPLY, 2005). Esta técnica realiza a análise de segmentos de DNA
27 com sequências repetidas em *tandem*, onde o número de cópias varia entre
28 diferentes cepas. MIRU-VNTR se baseia na amplificação do DNA através de uma
29 PCR e no cálculo do número de repetições com base no tamanho do produto
30 amplificado (SUPPLY, 2005). É apresenta poder discriminatório maior que o RFLP e
31 o *spoligotyping* (CANNAS et al., 2016).

32 O *spoligotyping* é um ensaio de hibridização que detecta a variabilidade nas
33 *Direct Repeat* (DR) do DNA de *M. tuberculosis*. Regiões DR consistem em um
34 número variável de cópias de uma sequência conservada de 36 pares de bases,

1 separados por espaçadores exclusivos. Cepas de *M. tuberculosis* variam no número
2 de DRs e na presença ou ausência de espaçadores específicos (KAMERBEEK et
3 al., 1997).

4 A utilização e a escolha dos diferentes métodos de epidemiologia molecular
5 devem ser feitas conforme o objetivo do estudo. A técnica de *spoligotyping* é muito
6 utilizada para estudos populacionais e para definições de distribuição de bacilos
7 circulantes. Já as técnicas de IS-6110 RFLP e MIRU-VNTR, são úteis para traçar
8 relações genéticas e epidemiológicas, possibilitando relacionar casos com surtos de
9 TB (JAGIESLKI et al., 2016). A partir da utilização de métodos moleculares, a
10 identificação genética das cepas de *M. tuberculosis* circulantes é facilitada, podendo-
11 se definir os focos de transmissão e contribuir para o controle da doença (PEREIRA
12 et al., 2013).

1 **3 OBJETIVOS**

2

3 **3.1 Geral**

4

5 Avaliar o laboratório como suporte para o controle da TB, em um Laboratório
6 de Micobactérias do Município de Rio Grande.

7

8 **3.2 Específicos**

9

- 10 a) Avaliar o desempenho do Teste Molecular Rápido (GeneXpert[®]) como
11 ferramenta para o diagnóstico da TB
- 12 b) Determinar a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo (VPP),
13 o valor preditivo negativo (VPN) e a acurácia dos testes BACTEC MGIT, TMR,
14 Microscopia de Ziehl Neelsen e Microscopia de Auramina;
- 15 c) Identificar os genótipos dos isolados de *M. tuberculosis*;
- 16 d) Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *M.*
17 *tuberculosis*;
- 18 e) Caracterizar o perfil clínico e epidemiológico dos pacientes com TB;

BIBLIOGRAFIA

- AARON, L. et al. Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review. *Clin Microbiol Infect*, v. 10, p. 388-98, 2004.
- ALIA, A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Central Asian Strain (CAS) lineage strains in Pakistan reveal lower diversity of MIRU *loci* than other strains. *Int J Mycobacteriol*, v. 3, v. 2, p. 108-16, 2014.
- ANDREWS, J. R. et al. Risk of progression to active tuberculosis following reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Infect Dis*, v. 54, p. 784-91, 2012.
- ARBEX, M. A. et al. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. *J Bras Pneumol*, v. 36, n. 5, p. 626-40, 2010.
- BAJRAMI, R. et al. Comparison of GeneXpert MTB/RIF and Conventional Methods for the Diagnosis of Tuberculosis in Kosovo. *J Infect Dev Ctries* v. 10, n. 4, p. 418-22, 2016.
- BD. Mycobacteria Growth Indicator Tube, OADC Enrichment, PANTA™ Antibiotic Mixture. 2001. Disponível em: < <https://www.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsi-ManualMGIT.pdf>> Acesso em: 20 de mar. 2017.
- BD. BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kit. For the Antimycobacterial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. 2002. Disponível em: <<https://www.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsi-960sire.pdf>> Acesso em: 05 de jan. 2017.
- BI, N. A. et al. A rapid loop-mediated isothermal amplification assay targeting hspX for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Jpn J Infect Dis*, v. 65, p. 247-51, 2012.
- BLAKEMORE, R. et al. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *J Clin Microbiol*, v. 48, n. 7, p. 2495-501, 2010.
- BRASIL. *Cadernos de Atenção Básica: Vigilância em Saúde*. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.
- BRASIL. *Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil*. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BRASIL. *Recomendações para o manejo da coinfeção TB/HIV em serviços de atenção especializada a pessoas vivendo com HIV/AIDS*. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- BRASIL. *Panorama da tuberculose no Brasil. Indicadores epidemiológicos e operacionais*. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. *Boletim Epidemiológico Tuberculose. Secretaria de Vigilância em Saúde*. Brasília: Ministério da Saúde, v. 47, n. 13, 2016.

BRUM, C. B. et al. The BACTEC MGIT™ 320 system as a laboratory tool to diagnose tuberculosis in a Brazilian hospital with a high prevalence of HIV infection. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 49, n. 1, p. 112-14, 2016.

CAFRUNE, Patricia Izquierdo. Avaliação da Técnica de Spoligotyping aplicada diretamente em amostras clínicas de pacientes com suspeita de tuberculose e caracterização epidemiológica. 2009. 105 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica - Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CANNAS, A. et al. Molecular Typing of *Mycobacterium Tuberculosis* Strains: A Fundamental Tool for Tuberculosis Control and Elimination. *Infect Dis Rep*, v. 8, n. 2, p. 6567, 2016

CDC. *CDC grand rounds: the TB/HIV syndemic*. Centers for Diseases Control and Prevention MMWR, v. 61, n. 26, p. 484-9, 2012.

CEPHEID. Xpert MTB/RIF Package Insert. *Rev B*, p. 301-1404, 2015.

CEVS. *Tuberculose no Rio Grande do Sul. Relatório técnico 2014 - 2015*. Porto alegre: Centro Estadual de Vigilância em Saúde, 2016.

CHIHOTA, V.N. et al. Liquid vs. solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource-constrained setting. *Int. J Tuberc Lung Dis*, v. 14, p. 1024-31, 2010.

COSTA, E. R. D. et al. *Mycobacterium tuberculosis* of the RDRio Genotype Is the Predominant Cause of Tuberculosis and Associated with Multidrug Resistance in Porto Alegre City, South Brazil. *J Clin Microbiol*, v. 51, n. 4, p. 1071-77, 2013.

COUTINHO, L. A. S. A. et al. Perfil Epidemiológico da Tuberculose no Município de João Pessoa - PB, entre 2007 - 2010. *R bras ci Saúde*, v. 16, n. 1, p. 35-42, 2012.

CROFTON, J.; MITCHISON D.A. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. *Br Med J*, v. 2, p. 1009-15, 1948.

DIRLIKOV, E.; RAVIGLIONE M.; SCANO F. Global Tuberculosis Control: Toward the 2015 Targets and Beyond. *Ann Intern Med*, v. 163, n. 1, p. 52-8, 2015.

DUCATI, R. G. et al. The resumption of consumption. A review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 101n. 7, p. 697-714, 2006.

GANDHI, N. R. et al. Nosocomial transmission of extensively drug-resistant tuberculosis in a rural hospital in South Africa. *J Infect Dis*, v. 207, p. 9-17, 2013.

HARRIS, T.G.; MEISSNER J. S.; PROOPS D. Delay in diagnosis leading to nosocomial transmission of tuberculosis at a New York City health care facility. *Am J Infect Control*, v. 41, p. 155-60, 2013.

HELB, D. M. et al, Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology, *J Clin Microbiol*, v. 48, p. 229-37, 2010.

HILLEMANN, D. et al. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *J Clin Microbiol*, v. 49, n. 4, p. 1202-05, 2011.

HONSCHA, G. et al. The laboratory as a tool to qualify tuberculosis diagnosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 12, n. 2, p. 218–20, 2008.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em 12 jan. 2017.

IRAM, S. et al. Rapid diagnosis of tuberculosis using Xpert MTB/RIF assay - Report from a developing country. *Pak J Med Sci*, v. 31, n. 1, p. 105-10, 2015.

IWAMOTO, T.; SONOBE T.; HAYASHI K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol*, v. 41, p. 2616-22, 2003.

JAGIELSKI, T. et al. Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*, v. 29, n. 2, 2016.

JAWAHAR, M. S. Current trends in chemotherapy of tuberculosis. *Indian J Med Res*, v. 120, n. 4, p. 398-417, 2004.

JENSEN, P. A. et al. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings. *MMWR Recomm Rep*. V. 54, n. 17, p. 1-141, 2005.

JONSSON, J. et al. Extensive nosocomial transmission of tuberculosis in a low-incidence country. *J Hosp Infect*, v. 83, p. 321-6, 2013.

KAMERBEEK, J. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, v. 35, p. 907-14, 1997.

KUHLEIS, D. et al. Tuberculosis in a southern Brazilian prison. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 7, p. 909-15, 2012.

LAWN, S. D. et al. Screening for HIV-associated tuberculosis and rifampicin resistance before antiretroviral therapy using the Xpert MTB/RIF assay: a prospective study. *PLoS Med*, v. 8, n. 7, p. e1001067, 2011.

LAWN, S.D.; ZUMLA, A. I. Tuberculosis. *Lancet*, v. 378, p. 57-72, 2011.

MAARTENS, G.; WILKINSON R. J. Tuberculosis. *Lancet*, v. 370, n. 9604, p. 2030-43, 2007.

MEYER-RATH, G. et al. The impact and cost of scaling up GeneXpert MTB/RIF in South Africa. *PLoS One*, v. 7, n. 5, p. e36966, 2012.

MILLER, A. C. et al. Missed Opportunities to Diagnose Tuberculosis Are Common Among Hospitalized Patients and Patients Seen in Emergency Departments. *Open Forum Infect Dis*. V. 2, n. 4, p. ofv171, 2015.

MIOTTO, P. et al. Early tuberculosis treatment monitoring by Xpert(R) MTB/ RIF. *Eur Respir J*, v. 39, n. 5, p. 1269-71, 2012.

MUTINGWENDE, I. et al. Development and evaluation of a rapid multiplex-PCR based system for *Mycobacterium tuberculosis* diagnosis using sputum samples. *J Microbiol Methods*, v. 116, p. 37-43, 2015.

NAKIYINGI, L.; NANKABIRWA H.; LAMORDE M. Tuberculosis diagnosis in resource-limited settings: Clinical use of GeneXpert in the diagnosis of smear-negative PTB: a case report. *Afr Health Sci*, v. 13, n. 2, 2013.

NIEMANN, S.; SUPPLY P. Diversity and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: moving to whole-genome-based approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med* v. 4, p. a021188, 2014.

PALOMINO, J. C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, p. 2720–22, 2002.

PALOMINO, J.C.; RAMOS D. F.; SILVA P. E. A. New anti-tuberculosis drugs: strategies, sources and new molecules. *Curr Med Chem*, v. 16, p. 1898-1904, 2009.

PAWLOWSKI, A. et al. Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Patho*, v. 8, n. 2, p. e1002464, 2012.

PEREIRA, A. M. et al. Análise molecular de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos em Goiânia, Goiás, por meio do RFLP-IS6110 e do 15 loci MIRU-VNTR. *Rev Patol Trop*, v. 42, n. 3, p. 275-288, 2013.

RIVERA, A. B. et al. Rapid and improved recovery rate of *Mycobacterium tuberculosis* in Mycobacteria Growth Indicator Tube combined with solid Löwenstein Jensen medium. *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 1, n. 5, p. 454-9, 1997.

SAEED, N. et al. Clinical manifestation of extrapulmonary tuberculosis. *Med Chann*, v. 18, n. 1, p. 80-3, 2012.

SIA, I. G. et al. Current Concepts in the Management of Tuberculosis. *Mayo Clin Proc*, v. 86, n. 4, p. 348-61, 2011.

SILVA, P. E. A. et al. Microcolony detection in thin layer culture as an alternative method for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Braz J Microbiol*, v. 38, p. 421-23, 2007.

SINAN-RS, Sistema de Informação de Agravos de Notificação - RS. Banco de dados agregados do DATASUS. Disponível em: <<http://200.198.173.165/scripts/tabcgi.exe?snet/tubercrsnet>>. Acesso em 10 jan. 2017.

STEINGART, K. R. et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, v. 6, n. 10, p. 664–74, 2006.

STEINGART, K. R. et al. Xpert(R) MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, v. 1, 2014.

SUPPLY, P. *Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of Mycobacterium tuberculosis: Technical Guide*. Instituto de Biologia / Instituto Pasteur de Lille, 2005. Disponível em: <<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/files/MIRU-VNTRtypingmanualv6.pdf>>. Acesso em 12 dez. 2016.

SYRE, H. et al. Rapid colorimetric method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin in liquid cultures. *J Clin Microbiol*, v. 41, n. 11, p. 5173-7, 2003.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *J Bras Pneumol*, v. 33, n. 3, p. 323-334, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TSUKAMURA, M. S.; MIZUNO, S.; TOYAMA, H. 1985. Taxonomic studies on the *Mycobacterium tuberculosis* series. *Microbiol Immunol*, v. 29, n. 4, p. 285-99, 1985.

UNAIDS. 90-90-90 Uma meta ambiciosa de tratamento para contribuir para o fim da epidemia de AIDS. Geneva: UNAIDS, 2015.

VALENÇA, M. et al. Prevalence of tuberculosis in prisons: risk factors and molecular epidemiology. *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 19, n. 10, p. 1182-7, 2015.

VAN EMBDEN, J. D. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*, v. 31, p. 406-9, 1993.

VITTOR, A. Y.; GARLAND, J. M.; GILMAN, R. H. Molecular Diagnosis of TB in the HIV Positive Population. *Ann Glob Health*, v. 80, n. 6, p. 476–85, 2014.

WALKER, T. M. et al. Contact investigations for outbreaks of *Mycobacterium tuberculosis*: advances through whole genome sequencing. *Clin Microbiol Infect*, v. 19, p. 796-802, 2013.

WHALEN, C. C. et al. Secondary attack rate of tuberculosis in urban households in Kampala, Uganda. *PLoS ONE*, v. 6, n. 2, p. e16137, 2011.

WHO. *Toman's tuberculosis case detection, treatment, and monitoring*. Geneva: World Health Organization, 2 ed., 2004.

WHO. *Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs*. Geneva: World Health Organization, 2008.

WHO. *Global Plan to Stop TB 2011-2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis*. Geneva: World Health Organization, 2010.

WHO. *Same-day diagnosis of tuberculosis by microscopy*. Geneva: World Health Organization, 2011a.

WHO. *Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis*. Geneva: World Health Organization, 2011b.

WHO. *Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis: policy statement*. Geneva: World Health Organization, 2011c.

WHO. *Systematic screening for active tuberculosis: principles and recommendations*. Geneva: World Health Organization, 2013

WHO. *Xpert MTB/RIF implementation manual: technical and operational 'how-to'; practical considerations*. Geneva: World Health Organization, 2014

WHO. *Global Tuberculosis Report 2016*. France: World Health Organization, 2016a.

WHO. *The Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification (TB-LAMP) for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Policy Guidance*. Geneva: World Health Organization, 2016b.

WHO, World Health Organization, Tuberculosis. Disponível em: <<http://www.who.int/tb/en/>>. Acesso em 13 jan. 2017.

ZIGNOL, M. et al. Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: An updated analysis, 2007-2010. *Bull World Health Organ*, v. 90, n. 2, p. 111-9, 2012.

ZUMLA, A. et al. Tuberculosis-current perspectives. *N Engl J Med*, v. 368, p. 745-55, 2013.

4 ARTIGOS PRONTOS PARA PUBLICAÇÃO

4.1 Primeiro artigo

Manuscrito a ser submetido a revista *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease (IJTLD)*.

As normas de submissão podem ser acessadas em:

<<http://www.theunion.org/what-we-do/journals/ijtld/information-for-authors>>

Fator de impacto: 2,148

1 **Xpert MTB/RIF[®] Assay, culture and microscopy, what is the best approach to**
2 **tuberculosis diagnosis in HIV/AIDS patients?**

3
4 Ana Júlia Reis¹, Ana Bárbara Scholante¹, Ivy Bastos Ramis¹, Andrea Von Groll¹,
5 Pedro Eduardo Almeida da Silva¹.

6
7 1. Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul,
8 Brazil.

9
10 **Running read:** Xpert MTB/RIF[®] Assay in HIV/AIDS patients

11
12 A word count of the summary: 200

13 A word count of the text: 2500

14 Number of references: 32

15 Number of tables: Two

16
17 **Corresponding author:**

18 Prof. Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva.

19 Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

20 Faculty of Medicine.

21 Rio Grande do Sul, Brazil.

22 Email: pedrefurg@gmail.com

23 Phone: 55-5332334633

24 Fax: 55-5332334633

25 ABSTRACT

26

27 **Background:** One of the main challenges for the control of tuberculosis (TB) is the
28 early identification of tuberculosis patients. For this, fast and accurate screening
29 methods, are necessary. **Objective:** Evaluate what is the best approach to
30 tuberculosis diagnosis, in HIV/AIDS patients. **Design:** A cross-sectional study was
31 performed, including 778 samples received in a Mycobacteria Laboratory in
32 HIV/AIDS Reference Hospital, in the period from April 2015 to April 2016. We
33 evaluated the methods, microscopy with Ziehl Neelsen (ZN), microscopy with
34 Auramine O (AO), BACTEC MGIT[®] liquid culture and Xpert MTB/RIF[®]. **Results:** The
35 TB prevalence was 20%, with the rate of TB/HIV coinfection of 54.7%. The Xpert
36 MTB/RIF showed higher sensitivity in case detection of TB, followed by liquid culture,
37 microscopy with AO and microscopy with ZN. **Conclusion:** The Xpert MTB/RIF[®]
38 comes up as a promising tool for TB diagnosis, showing speed associated to high
39 specificity and sensitivity. We verified the possibility of Xpert MTB/RIF[®] to replace
40 bacilloscopy as a rapid diagnostic method and even to be used as a gold standard
41 for the diagnosis of TB in the future, since it appears to have the capacity to detect
42 cases not identified by the liquid culture.

43

44 **Key words:** TB/HIV coinfection, pulmonary tuberculosis, extrapulmonary
45 tuberculosis, diagnosis, *Mycobacterium tuberculosis*

46

47 INTRODUCTION

48

49 Despite the fact that tuberculosis (TB) is a curable disease in most cases, it
50 remains as one of the main causes of death worldwide, being the leading cause of
51 death among HIV-positive patients. One of the major challenges in controlling TB
52 around the world is the identification of all TB cases, considering that around three
53 million people are not diagnosed annually.¹ Furthermore, coinfection TB/HIV leads to
54 diagnosis challenges, because the coinfection TB/HIV is associated to a different
55 clinical presentation, higher frequency of negative bacilloscopy, extrapulmonary TB
56 and normal chest radiography.²⁻⁴

57 Conventional methods used for the TB diagnosis requires longer time for the
58 diagnosis, mycobacteria isolation and *in vitro* assays, as is the case of culture, or
59 shows low sensitivity, as in the case of bacilloscopy. On this account, patients can be
60 mistakenly treated and resistant strains continues to be disseminated.⁵ The culture of
61 bacilli are currently considered the gold standard in TB diagnosis.⁶

62 Considering the limitations of the current diagnostic techniques, the increase
63 on the number of TB and coinfection TB/HIV, as well a cases of drug resistance,
64 stands out the urgency of rapid and accurate screening methods, that can be
65 available in resource-limited settings and which, besides diagnosing, allow to perform

66 the drug susceptibility test (DST). With the improving the early diagnosis, the bacilli
67 dissemination can be avoided, thus reducing the number of cases of TB.^{5, 7-9}

68 The Xpert MTB/RIF[®] comes up as a fast and precise diagnosis method. In
69 addition to the capacity to specifically detect bacteria of the *Mycobacterium*
70 *tuberculosis* complex (MTBC) directly from clinical samples, it is also capable to
71 detect rifampicin (RIF) resistance.¹⁰⁻¹³ This method comes up as a possible
72 alternative to bacilloscopy because provide fast results, reflecting in the reduction of
73 mortality caused by TB.^{5, 14}

74 The aim of this study was to evaluate the performance of the Xpert MTB/RIF,
75 liquid culture and microscopy to TB detection cases, in HIV/AIDS patients.

76

77 **MATERIALS AND METHODS**

78

79 **Study design**

80

81 A cross-sectional study was performed, including all pulmonary and
82 extrapulmonary samples in HIV-positive patients and HIV-negative patients, received
83 from April 22nd, 2015 to April 21st, 2016, at the Mycobacteria Laboratory of Hospital
84 Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr, at Rio Grande/RS, Brazil, reference hospital
85 to patients with HIV/AIDS. The data collection was performed in medical records and
86 in the Mycobacteria Laboratory database. The results of diagnosis tests, clinical and
87 epidemiological specificities of each patient, was collected.

88 Samples with insufficient amount to be processed in every evaluated method,
89 contaminated samples in liquid culture and invalidated samples by the Xpert
90 MTB/RIF, were excluded of the study.

91

92 **Experimental activities**

93

94 For the comparison of diagnosis methods, were evaluated microscopy with
95 Ziehl Neelsen (ZN) and Auramine O (AO) staining, liquid culture on BACTEC MGIT[®]
96 (*BD - Becton, Dickinson and Company*) and Xpert MTB/RIF[®] (*Cepheid*). For the
97 detection of TB cases were used the methods BACTEC MGIT, with confirmation by
98 IS-6110,¹⁵ and/or Xpert MTB/RIF.

99 Initially, samples as sputum, bronchoalveolar lavage, tracheal aspirate, biopsy,
100 were decontaminated using the N-acetyl-cysteine solution and sodium hydroxide
101 (NALC-NaOH).¹⁶ In sequence, all samples were centrifuged and were used 100 µL of
102 sample for the smears to be stained by ZN and AO methods, 500 µL for liquid culture
103 and 500 µL for the Xpert MTB/RIF.

104 The ZN and AO staining were performed according to the Brazilian Health
105 Ministry recommendations. The smears stained by the method with ZN were also
106 analyzed in all extension of the slide, however with immersion, using 100x objective
107 lens. The smears stained by the method with AO were analyzed in all extension of
108 the slide, using the 40x objective lens, in ultraviolet light microscope.¹⁶

109 For the realization of BACTEC MGIT liquid culture, after descontamination and
110 centrifugation, samples were incubated until obtain positive results, or up to 45 days
111 for negative cases, in liquid medium MiddleBrook 7H9 containing 800 µL of
112 PANTA+OADC (Polymyxin B, Amphotericin B, Naladixic Acid, Trimethoprim,
113 Azlocillin + Oleic acid, Albumin, Dextrose, Catalase), solution.¹⁷

114 Finally, the Xpert MTB/RIF is based on the performance of a RT-PCR for the
115 TB diagnosis and *rpoB* gene analysis for the RIF resistance detection. Initially, the
116 samples was liquefed and inactivated. After inactivation, 2 mL sample was
117 transferred to the cartridge, which was led to the equipment. In the equipament, the
118 sample is washed and filtered, the ultrasonic lysis is used to release DNA and DNA
119 molecules are mix with dry PCR reagents. The amplification and detection of *M.*
120 *tuberculosis*, in an integrated reaction, is realized. The results are released after two
121 hours, with identification of the *M. tuberculosis* complex and detection of
122 susceptibility profile for RIF.⁵Positive results are detected by a fluorescent sign, being
123 considered, according to the number of threshold cycles (TC), the following levels of
124 detection: very low (TC ≥ 28), low (28 > TC > 22), medium (22 > TC > 16) and high
125 (TC ≤ 16). The TC is defined as the number of cycles necessary to generate the
126 fluorescent sign and is inversely proportional to the amount of nucleic acid present in
127 the sample.

128 **Results analysis**

129

130 The data were tabulated in Excel, and subsequently analyzed by SPSS,
131 version 20.0. From the results obtained, the sensitivity, specificity, positive predictive
132 value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy were calculated for each
133 diagnosis method evaluated.

134

135 **Ethical aspects**

136

137 The study was approved by the Health Research Ethics Committee of the
138 Universidade Federal do Rio Grande (FURG), under the number 128/2016.

139

140 **RESULTS**

141

142 A total of 423 patients, from 778 samples, were processed during the study
143 period. However, 88.9% (376/423) patients were included on the diagnosis methods
144 comparison, of these 11.1% (47/423) remaining samples did not have results for all
145 four evaluated methods. Pulmonary and extrapulmonary samples were respectively
146 69.4% (261/376) and 30.7% (115/376).

147 Among the evaluated patients, 20% (75/376) were positive for TB in the liquid
148 culture and/or Xpert MTB/RIF, of these 81.3% (61/75) were pulmonary samples and
149 18.4% (14/75) extrapulmonary samples. Of these, had an average age of 39.4 (\pm
150 13.6), 64% (48/75) were males, 54.7% (41/75) were HIV-positive and 38.7% (29/75)
151 were previously treated for TB. Between the patients with pulmonary samples, 49.2%
152 (30/61) were HIV-positive and among the patients with extrapulmonary samples,
153 78.6% (11/14) were HIV-positive (Table 1).

154 Of the 75 patients, 92.0% (69/75), 82.7% (62/75), 70.7% (53/75) and 62.7%
155 (47/75) were positive to Xpert MTB/RIF, liquid culture, microscopy with AO and
156 microscopy with ZN, respectively. When evaluated only the HIV-positive patients,
157 90.2% (37/41), 80.5% (33/41), 73.2% (30/41) and 61.0% (25/41) were positive to
158 Xpert MTB/RIF, liquid culture, microscopy with AO and microscopy with ZN
159 respectively. Moreover, among these 75 positive patients, 6.6% (5/75) were detected
160 by liquid culture and not by Xpert MTB/RIF, while 17.3% (13/75) were detected by
161 Xpert MTB/RIF and not by liquid culture (Table 2). Among the positive samples in

162 Xpert MTB/RIF, six, three and four patients showed very low, low and medium bacilli
163 concentration on Xpert MTB/RIF, respectively. Still, among the 13 patients diagnosed
164 by the Xpert MTB/RIF and not identified in liquid culture, 61.5% (8/13) were HIV-
165 positive, and 87.5% (7/8) showed a concentration of bacilli too low or low to the Xpert
166 MTB/RIF.

167 We evaluated the values corresponding to sensitivity, specificity, accuracy,
168 PPV and NPV of all methods for the group of the patients with pulmonary and
169 extrapulmonary samples, and group of HIV-positive and HIV-negative patients (Table
170 2). In both groups, the Xpert MTB/RIF method showed higher sensitivity in the TB
171 cases detection.

172

173 **DISCUSSION**

174

175 One of the main challenges for controlling TB is the early and accurate
176 detection of the cases of the disease, since this still as one of the major causes of
177 death worldwide. In this study, among the patients tested for TB, 20% were positive,
178 which demonstrates a high prevalence, when compared with a study conducted in a
179 prison in Southern Brazil, population usually more exposed to TB, that found a
180 prevalence of 12.9%.¹⁸ The high prevalence of patients positive for TB may be
181 related with the rate of patients coinfecting with HIV, which in this study corresponded
182 to 54.6% of patients. This due to the fact that the population living with HIV have 40
183 times more chance to develop TB when compared to the general population.¹ The
184 coinfection prevalence in this study was superior to the found in other studies in
185 south of Brazil.^{18,19} This can be justified by the fact that the study was performed with
186 patients of a reference hospital for HIV-positive patients.

187 The diagnosis of TB in HIV-positive patients, who usually have extrapulmonary
188 samples, is a huge challenge since these are generally obtained from deep tissues
189 and are frequently paucibacillary, what contributes to the decrease of the sensitivity
190 of the diagnosis methods.^{20,21} In this study we found 18.4% of TB cases in
191 extrapulmonary samples, being that, 78.6% were HIV-positive, strengthening the
192 idea brought by some studies that suggests an increased risk of extrapulmonary TB
193 among HIV-positive patients.²²

194 For both evaluated groups, pulmonary, extrapulmonary, HIV-positive and HIV-
195 negative, the Xpert MTB/RIF presented better results of sensitivity, PPV, NPV and

196 accuracy, followed by BACTEC MGIT, microscopy with AO staining and microscopy
197 ZN staining. Among pulmonary samples, the Xpert MTB/RIF presented a sensitivity
198 of 95%. Previous studies indicated variations between 87% and 93% on the
199 method's sensitivity for pulmonary samples.²³⁻²⁵ The sensitivity of geneXpert was
200 78.6% to extrapulmonary samples, although lower than other studies, it was higher
201 than liquid culture.^{26,27} Among HIV-positive patients the Xpert MTB/RIF presented
202 high accuracy in the detection of TB cases, as well as sensitivity of 90.2% among
203 HIV-positive patients and 93.75% among HIV-negative patients.

204 The microscopy with ZN and AO stainings, despite being fast and low cost
205 tools, showed low sensitivity in cases detection when compared to other evaluated
206 methods. However, the sensitivity of microscopy with AO was higher than with ZN. In
207 general, is observed an increase between 8-10% in patients detection by microscopy
208 with AO when compared to the traditional ZN.^{28,29} The increase of the sensitivity can
209 be attributed to some factors, such as, a higher mycolic acid absorption capacity with
210 the utilization of the AO dye when compared to fuchsin used on ZN staining, leading
211 to a higher number of bacilli stained; and the identification and reading of the slides
212 more easy, since the staining allows an better contrast between bacilli and the
213 background of the smear.³⁰

214 Considering the fact that patients were declared positive based on the results
215 obtained in liquid culture and/or Xpert MTB/RIF, the specificity of both methods was
216 100%. In this study liquid culture detected four cases undetected by Xpert MTB/RIF,
217 while the Xpert MTB/RIF detected 13 cases undetected by liquid culture. Despite the
218 possibility of detecting unviable bacilli due to previous treatment,³¹ 30.8% (4/13) of
219 the patients detected by Xpert MTB/RIF and negative on culture were not previously
220 treated for TB and 30.8% (4/13) did not show this information, what it shows that the
221 method really can be more sensitive and specific than the culture, currently
222 considered gold standard. Furthermore, among the 13 patients diagnosed by the
223 Xpert MTB/RIF and not identified in liquid culture, 61.5% (8/13) were HIV-positive,
224 being that 87.5% (7/8) showed a concentration of bacilli very low or low on the Xpert
225 MTB/RIF. This indicates that this method, besides to be faster, may have a higher
226 capacity to detect low bacilli concentrations when compared to liquid culture.

227 In general, the sensitivity for extrapulmonary samples were lower, for all
228 methods evaluated, due to the fact that they are commonly paucibacillary. However,
229 the Xpert MTB/RIF was the method that showed greater sensitivity in this group of

230 samples. When we compare Xpert MTB/RIF with microscopy of ZN, among HIV-
231 positive patients, we observed that the Xpert MTB/RIF detected 90.2% of the cases,
232 while the smear ZN detected 61.0%. This results in an increase of 29.2% in detecting
233 cases when performed the Xpert MTB/RIF, which is an important factor in the rapid e
234 correct diagnosis of TB among HIV positive, especially due to the fact that these
235 commonly have negative results in the sputum smear microscopy.

236 The effective TB diagnosis is one of the main steps for the disease control,
237 allowing a fast drug therapy implementation and contributing to the reduction of
238 morbidity and mortality rates of the disease and interrupting the chain of
239 transmission.¹ In this scenario, the Xpert MTB/RIF comes up as a promising tool for
240 TB diagnosis in HIV patients, enabling the detection of *M. tuberculosis* in two hours,
241 associated to high specificity and sensitivity.¹³ It should be emphasized that the
242 culture in liquid medium, currently considered the gold standard for the diagnosis of
243 TB, requires seven to 14 days for the diagnosis, in addition to the need of later
244 molecular confirmation for identification of *M. tuberculosis* complex.¹⁵

245 In addition to the speed and high sensitivity, the Xpert MTB/RIF is able to
246 detect resistance to RIF, something that the other diagnostic methods currently
247 available do not allow. For the determination of the profile of antimicrobial
248 susceptibility through culture (BACTEC MGIT)mgit), is needed the bacterial growth,
249 requiring more time, skilled workforce and high level of biosafety. In the case of xpert
250 MTB/RIF, this is not necessary, because this requiring limited concern in relation to
251 biosecurity during its use, since the same is carried out directly from clinical
252 specimen.⁵

253 With the high sensitivity for groups of extrapulmonary samples and of HIV-
254 positive patients, when compared to other methods, the Xpert MTB/RIF shows
255 greater detection capacity among populations with high rates of paucibacillary
256 samples, as for example the population living with HIV/AIDS. In this sense, the Xpert
257 MTB/RIF, proves to be an effective method for identification of TB in HIV-positive
258 patients.

259 The findings of our study demonstrate the advantages of Xpert MTB/RIF, in
260 relation to other methods currently available for the diagnosis of TB in HIV-positive
261 patients. In this sense, the Xpert MTB/RIF offers a promising solution for the
262 challenges related to diagnostic of TB. Its use in levels of primary care health could

263 lead to a reduction in the incidence of TB and in the mortality for coinfection TB/HIV
264 in areas of high HIV and TB prevalence.

265 However, the Xpert MTB/RIF is still not universally available and its high cost
266 remain as a challenge to its decentralised implementation, where today the sputum
267 smear microscopy is available.³² Because of this, the realization of the Xper MTB/RIF
268 still does not eliminate the need for microscopy and culture, since they are required
269 to monitor the treatment the progression and to evaluate the results obtained by the
270 Xpert MTB/RIF.¹

REFERENCES

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. France: WHO, 2016.
2. Aaron L, Saadoun D, Calatroni I, et al. Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 (5): 388-398.
3. CDC. CDC grand rounds: the TB/HIV syndemic. Centers for Diseases Control and Prevention MMWR 2012; 61 (26): 484-489.
4. Vittor A Y, Garland J M, Gilman R H. Molecular Diagnosis of TB in the HIV Positive Population. *Annals of Global Health* 2014; 80 (6): 476-485.
5. World Health Organization. Xpert MTB/RIF implementation manual: technical and operational 'how-to'; practical considerations. Geneva: WHO, 2014.
6. Brum C B, Ramos D F, Abilleira F de S, Silva A B, von Groll A, Silva P E. The BACTEC MGIT™ 320 system as a laboratory tool to diagnose tuberculosis in a Brazilian hospital with a high prevalence of HIV infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 2016; 49 (1): 112-114.
7. Saeed N, Islam A U, Burki H B, Nizamuddin S. Clinical manifestation of extrapulmonary tuberculosis. *Med Chann* 2012; 18 (1): 80-83.
8. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn C F. Tuberculosis-current perspectives. *N Engl J Med* 2013; 368: 745-755.
9. Dirlikov E, Raviglione M, Scano F. Global Tuberculosis Control: Toward the 2015 Targets and Beyond. *Ann Intern Med* 2015; 163 (1): 52-58.
10. Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Boehme C, Richter E. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *J Clin Microbiol* 2011; 49(4): 1202-1205.
11. Meyer-Rath G, Schnippel K, Long L, et al. The impact and cost of scaling up GeneXpert MTB/RIF in South Africa. *PLoS One* 2012; 7(5): e36966.
12. Mutingwende I, Vermeulen U, Steyn F, Viljoen H, Grobler A. Development and evaluation of a rapid multiplex-PCR based system for *Mycobacterium tuberculosis* diagnosis using sputum samples. *Journal of Microbiological Methods* 2015; 116: 37-43.
13. Bajrami R, Mulliqi G, Kurti A, Lila G, Raka L. Comparison of GeneXpert MTB/RIF and Conventional Methods for the Diagnosis of Tuberculosis in Kosovo. *J Infect Dev Ctries* 2016; 10 (4): 418-422.
14. Lawn S D, Zumla A I. Tuberculosis. *Lancet* 2011; 378: 57-72.

15. Del Portillo P, Thomas M C, Martínez E, et al. Multiprimer PCR System for Differential Identification of Mycobacteria in Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 1996; 34(2): 324–328.
16. Ministério da Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília: MS; 2008.
17. Becton, Dickinson and Company. Mycobacteria Growth Indicator Tube, OADC Enrichment, PANTA™ Antibiotic Mixture. United States: BD, 2002.
18. Valença M S, Scaini J L R, Abileira F S, Gonçalves C V, von Groll A, Silva P E A. Prevalence of tuberculosis in prisons: risk factors and molecular epidemiology. *Tuberculosis and Lung Disease* 2015; 19(10): 1182-1187.
19. von Groll A, Martin A, Felix C, et al. Fitness study of the RD^{Rio} lineage and Latin American-Mediterranean family of *Mycobacterium tuberculosis* in the city of Rio Grande, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 58: 119-127.
20. Maynard-Smith L, Larke N, Peters J A, Lawn SD. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary and pulmonary tuberculosis when testing non-respiratory samples: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 709.
21. Lee, J Y. Diagnosis and Treatment of Extrapulmonary Tuberculosis. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 2015; 78(2): 47-55.
22. Shivakoti R, Sharma D, Mamoon G, Pham K. Association of HIV infection with extrapulmonary tuberculosis: a systematic review. *Infection* 2017; 45(1): 11-21.
23. Mazzola E, Arosio M, Nava A, Fanti D, Gesu G, Farina C. Performance of real-time PCR Xpert ®MTB/RIF in diagnosing extrapulmonary tuberculosis. *Infez Med* 2016; 24(4): 304-309.
24. Moussa H S, Bayoumi F S, Ali M S. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF assay for direct diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Saudi Med J* 2016; 37(10).
25. Agrawal M, Bajaj A, Bhatia V, Dutt S. Comparative Study of GeneXpert with ZN Stain and Culture in Samples of Suspected Pulmonary Tuberculosis. *J Clin Diagn Res* 2016; 10(5): DC09-12.
26. Denkinger C M, Schumacher S G, Boehme C C, Dendukuri N, Pai M, Steingart K R. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2014; 44(2): 435-446.
27. Fanosie A, Gelaw B, Tessema B, Tesfay W, Admasu A, Yitayew G. *Mycobacterium tuberculosis* Complex and HIV Co-Infection among Extrapulmonary Tuberculosis Suspected Cases at the University of Gondar Hospital, Northwestern Ethiopia. *PLoS One* 2016; 11(3): e0150646.

28. Bonnet M, Gagnidze L, Guerin P J, et al. Evaluation of combined LED-fluorescence microscopy and bleach sedimentation for diagnosis of tuberculosis at peripheral health service level. *PloS one* 2011; 6(5): e20175.
29. Xia H, Song Y Y, Zhao B, et al. Multicentre evaluation of Ziehl-Neelsen and light-emitting diode fluorescence microscopy in China. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; 17(1): 107-112.
30. Reza L W, Satyanarayna S, Enarson D A, et al. LED-Fluorescence Microscopy for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis under Programmatic Conditions in India. *PLoS One* 2013; 8(10): e75566.
31. Miotto P, Bigoni S, Migliori G B, Matteelli A, Cirillo D M. Early tuberculosis treatment monitoring by Xpert(R) MTB/ RIF. *Eur Respir J* 2012; 39(5): 1269-1271.
32. Raizada N, Sachdeva K S, Sreenivas A, et al. Catching the Missing Million: Experiences in Enhancing TB & DR-TB Detection by Providing Upfront Xpert MTB/RIF Testing for People Living with HIV in India. *PLoS One* 2015; 10(2): e0116721.

Table 1: Relationship between the type of sample and the presence or absence of HIV infection in patients with pulmonary and extrapulmonary TB.

Type of sample	HIV*-Positive		HIV-Negative		HIV Uninformed		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Pulmonary	30	49.2	15	24.6	16	26.2	61	100.0
Extrapulmonary	11	78.6	1	7.1	2	14.3	14	100.0
Total	41	54.7	16	21.3	18	24.0	75	100.0

*HIV: Human Immunodeficiency Virus.

Table 2: Sensitivity, specificity, accuracy and predictive values for microscopy, liquid culture and Xpert MTB/RIF.

PULMONARY					
	S [‡] (%)	SP [§] (%)	A [€] (%)	PPV [¥] (%)	NPV ^ζ (%)
Xpert MTB/RIF	95.10	100.00	99.00	100.00	99.00
CULTURE	85.25	100.00	97.00	100.00	96.00
ZN*	68.85	99.00	92.00	95.00	91.00
AO [†]	72.10	99.00	93.00	96.00	92.00
EXTRAPULMONARY					
	S (%)	SP (%)	A (%)	PPV (%)	NPV (%)
Xpert MTB/RIF	78.60	100.00	97.00	100.00	97.00
CULTURE	71.40	100.00	97.00	100.00	96.00
ZN	35.70	99.00	92.00	95.00	91.00
AO	64.30	99.01	95.00	90.00	95.00
HIV-POSITIVE					
	S (%)	SP (%)	A (%)	PPV (%)	NPV (%)
Xpert MTB/RIF	90.20	100.00	98.00	100.00	97.00
CULTURE	80.50	100.00	95.00	100.00	94.00
ZN	61.00	99.21	90.00	96.00	89.00
AO	73.20	98.43	92.00	94.00	92.00
HIV-NEGATIVE					
	S (%)	SP (%)	A (%)	PPV (%)	NPV (%)
Xpert MTB/RIF	93.75	100.00	98.00	100.00	98.00
CULTURE	87.50	100.00	96.00	100.00	95.00
ZN	68.75	100.00	91.00	100.00	89.00
AO	62.50	100.00	89.00	100.00	87.00

*ZN: microscopy with Ziehl Neelsen staining; [†]AO: microscopy with auramine staining; [‡]S: sensitivity; [§]SP: specificity; [€]A: accuracy; [¥]PPV: positive predictive value; ^ζNPV: negative predictive value

4.2 Segundo artigo

Manuscrito a ser submetido a revista *Tuberculosis*.

As normas de submissão podem ser acessadas em:

<https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/638428?generatepdf=true>

Fator de impacto: 2,69

1 **NOSOCOMAL TRANSMISSION OF *Mycobacterium tuberculosis* STRAINS IN A**
2 **REFERENCE HOSPITAL FOR HIV POSITIVE PATIENTS**

3
4 Ana Júlia Reis¹, Ana Bárbara Scholante¹, Ivy Bastos Ramis¹, Andrea Von Groll¹, Pedro
5 Eduardo Almeida da Silva¹

6
7 1. Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio
8 Grande do Sul, Brazil. 96200-400.

9
10 **Corresponding author:**

11 Prof. Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva.

12 Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

13 Faculty of Medicine,

14 Rio Grande do Sul, Brazil.

15 Email: pedrefurg@gmail.com

16 Phone: 55-5332334633

17 Fax: 55-5332334633

18
19 **Author's contribution:** Concept of study – AJR, IBR, AVG, PEAS. Plan of study – AJR,
20 IBR, PEAS. Collection of data – AJR, ABS. Analysis of results: AJR, ABS, IBR. Drafting of
21 manuscript – AJR, IBR, AVG. Study supervision – PEAS.

22 **Sumarry**

23

24 Tuberculosis (TB) affect million of people worldwide, and the *Mycobacterium*
25 *tuberculosis* transmission has been associated to healthcare settings. The aim of this
26 study was to characterize the dynamics of TB transmission, using 15 loci MIRU-VNTR,
27 among patients treated at a reference hospital for HIV, in the extreme south of Brazil. A
28 cross-sectional study was performed, including pulmonary and extrapulmonary samples.
29 All samples positive in BACTEC MGIT® and with molecular confirmation by IS-6110, were
30 submitted to genotyping and drug suscetibility testing (DST). A total of 68 *M. tuberculosis*
31 isolates were evaluated, of which 54.4% were HIV positive. In genotyping, 58.8% were
32 distributed in eight clusters. We observed epidemiological relationships among the four
33 largest clusters formed, where 90.6% of the patients presented a relationship between the
34 dates of consultations, exams realization and hospitalizations in the hospital. Among all
35 the isolates evaluated, in DST 11.8% were resistant to at least one of the tested drugs.
36 The occurrence of possible nosocomial transmission of TB was verified. The
37 establishment of infection control measures, as early diagnosis and effective treatment are
38 crucial elements for the non-dissemination of *M. tuberculosis* in health establishment,
39 especially those with high disease burden, such as reference hospitals for HIV positive
40 patients.

41

42 **Keywords:** *M. tuberculosis* transmission, MIRU-VNTR, Coinfection TB/HIV.

43 INTRODUCTION

44

45 Tuberculosis (TB) is a public health problem, affecting millions of people worldwide
46 annually [1]. The *Mycobacterium tuberculosis* transmission has been directly associated to
47 healthcare, being described as a serious problem in hospital environmental [2-4]. TB
48 outbreaks are frequently reported in hospitals and in populations with high prevalence of
49 HIV infection [2,3]. This is mainly due to the lack of fast and accurate diagnostic, high
50 prevalence of drug resistant strains and failures in isolation measures and approaches to
51 biosafety [1]. Furthermore, drug resistant is increasing in vulnerable population.

52 Therefore, the improvement in the TB control strategies associated to early
53 diagnostic and drug resistant cases detection becomes urgently necessary [5,6]. Beside of
54 diagnostic approach, the development and introduction of different genotyping methods of
55 *Mycobacterium tuberculosis* have significantly improved the knowledge about its
56 transmission, phylogeny and evolution [7].

57 Currently, Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem
58 Repeat (MIRU-VNTR) is considered the gold standard for *M. tuberculosis* genotyping [8].
59 This technique is useful for tracing genetic and epidemiological relationships, enabling to
60 relate cases with TB outbreaks [9]. The method allows the analysis of 12, 15 or 24 *loci*,
61 being this number related to the number of genomic regions evaluated. The 12 and 15
62 MIRU-VNTR are often used for epidemiological studies, while the 24 *loci* MIRU-VNTR is
63 indicated for phylogenetic studies [10].

64 Thus, the aim of this study was to characterize the dynamics of *M. tuberculosis*
65 transmission using the 15 *loci* MIRU-VNTR method, among patients treated for TB at a
66 reference hospital for HIV, in the south of Brazil.

67 MATERIALS AND METHODS

68

69 Study design

70

71 A cross-sectional study was performed, including all pulmonary and extrapulmonary
72 samples, received at the Mycobacteria Laboratory of Hospital Universitário Dr. Miguel Riet
73 Correa Jr., at Rio Grande/RS, Brazil, from April 2015 to April 2016. The data collection
74 was performed in medical records and in the Mycobacteria Laboratory database. It was
75 collected clinical and epidemiological specificities of all patients.

76

77 Experimental activities

78

79 Considering that more than one sample of the same patient could be received, only
80 the first positive sample by the liquid culture in BACTEC™ MGIT™ (BD - Becton,
81 Dickinson and Company) with molecular confirmation of the *M. tuberculosis* complex by
82 IS-6110 [11] was subculture on Ogawa-Kudoh, incubated at 37°C for 4 to 8 weeks and in
83 sequence, was used for drug susceptibility testing and submitted to DNA extraction, for
84 genotyping analysis. Were excluded from the study those samples that did not show any
85 growth on Ogawa-Kudoh culture medium. The clinical isolates were stored in the sample
86 bank of the Mycobacteria Laboratory da FURG.

87

88 Genotyping

89

- 90 • DNA extraction

91 For DNA extraction, the mycobacteria colonies cultivated in Ogawa-Kudoh medium
92 were resuspended in Tris EDTA 1x and incubated at 80°C for 30 minutes. In sequence,
93 the suspension was centrifuged at 5.000 rpm for 5 minutes for the collection of the
94 supernatant containing the DNA. This was stored at -20 ° C for further use in genotyping
95 and susceptibility test.

96

- 97 • MIRU-VNTR

98 The MIRU-VNTR was performed according to Supply *et al.* (2005) [12] using the 15
99 *loci* analysis. The sizes of fragments amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) were
100 determined by the variable tandem repetition of each locus. These were visualized trough

101 3% agarose gel eletrophoresis, stained with ethidium bromide 0.001 mg/ml. After staining
102 with ethidium bromide, was carried out the visualization in fluorescence under UV radiation
103 emission. It was used 50 bases pairs (bp) and 100 bp DNA ladder (LudwigBiotec[®]) to
104 define the size of the PCR products.

105

106 **Susceptibility test**

107

108 The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) was performed by
109 the resazurin microtiter assay (REMA), as described by Palomino *et al.* (2002) [13]. The
110 method consists on a serial microdilution in 96-well plates, using resazurin as cell viability
111 indicator with an oxi-reduction reaction. We evaluated the *M. tuberculosis* strains
112 susceptibility against isoniazid (INH), rifampicin (RIF), ethambutol (EMB) and streptomycin
113 (SM). The cut points used for INH, RIF, EMB and SM were 0.25 µg/mL, 0.5 µg/mL, 4
114 µg/mL and 1 µg/mL, respectively [14,15]. MIC was defined as the lowest concentration of
115 the antimicrobial capable of inhibiting bacterial growth.

116

117 **Results analysis**

118

119 For the data analysis was used the software SPSS 20.0. The calculation of allelic
120 diversity (h) of each MIRU-VTNR locus was performed using the formula $h = 1 - \sum x_i^2$
121 $[(n/n - 1)]$ [16]. The Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI) was calculated using the
122 formula $HGDI = 1 - [1/N (N-1) \sum x_j (x_j - 1)]$ [17]. Finally, the dendogram was obtained on
123 MIRU-VNTR *plus* (available <http://www.MIRU-VNTRplus.org>).

124

125 **Ethical aspects**

126

127 The study was approved by the Health Research Ethics Committee of the
128 Universidade Federal do Rio Grande (FURG), under the number 128/2016.

129 RESULTS

130

131 In this study, samples of 71 of 778 patients were considered positive by BACTEC
132 MGIT and *IS-6110*. However, after inoculated in Ogawa-Kudoh, only 95.8% (68/71)
133 isolates had bacterial growth and were used in the genotyping and susceptibility tests. Of
134 the 68 patients whose isolates were used for testing of susceptibility and genotyping,
135 57.3% (39/68) were males, with a mean age of 37.8 ± 13.1 years. Considering the clinical
136 data, 83.8% (57/68) were pulmonary samples, 54.4% (37/68) were HIV positive and 36.8%
137 (25/68) had previous TB treatment. Moreover, among patients with previous treatment,
138 66.7% (14/21) were HIV-positive.

139 In genotyping, 58.8% (40/68) of the *M. tuberculosis* strains were distributed in eight
140 clusters, containing from two to nine isolates per cluster (Figure 1). The discriminatory
141 power of the 15 *loci* MIRU-VNTR in the studied samples was 0.9478. Values of allelic
142 diversity were calculated for all locus (Table 1). The *loci* MIRU 10, MIRU 26, MIRU 40,
143 Mtub4, QUB11b, QUB26 presented high discriminatory power ($h \geq 0.6$). The other *loci* had
144 moderate ($0.3 \leq h \leq 0.6$) and low ($h \leq 0.3$) discriminatory power.

145 When the epidemiological relations among the clustered patients were evaluated, it
146 was observed that in clusters 1, 4, 5 and 7, which represented 80% (32/40) of the
147 clustered patients, most patients had records in the hospital during the same period, either
148 through consultations, exams realization or hospitalizations. Moreover, the clusters 1 and
149 4 had two patients residing in the same neighborhood and cluster 5 had three (Table 2 and
150 Figure 2). For the clusters 2, 3, 6 and 8, that formed two patients each, it was not possible
151 to trace relationship.

152 Regarding the antimicrobial susceptibility test, 88.2% (60/68) of the *M. tuberculosis*
153 strains were susceptible to all tested drugs and 11.8% (8/68) were resistant to at least one
154 of them. Two strains were resistant to INH and RIF, two resistant to INH and EMB and four
155 monoresistant, one for each drug tested: INH, RIF, EMB and STR (Table 3). When
156 resistance profiles were evaluated, according to the clusters, resistant patients were found
157 in distinct groups, except for two strains with resistance to INH and EMB and one with
158 resistance to EMB, who were grouped in the cluster 4, all HIV-positive. In addition, among
159 the patients with resistant strains, 50% (4/8) had been treated for TB previously and were
160 not clustered with other resistant strains (Table 4).

161 DISCUSSION

162

163 As the number of TB cases is increasing globally [1], the early diagnosis of the
164 disease and the determination of the main focus of the *M. tuberculosis* transmission is
165 essential for interrupting the chain of the bacilli transmission and for an effective TB control
166 [18]. This study identified a prevalence of TB/HIV coinfection of 54.4%. In addition, 66.7%
167 of patients with previous TB treatment were HIV-positive. Studies relate the occurrence of
168 previous TB treatments among HIV-positive patients, with the fact that the presence of HIV
169 infection leads to the occurrence of adverse outcomes in treatment, mainly related to
170 abandonment, usually due to the difficulty of monitoring during treatment [19,20]. Due to
171 the state of immunosuppression presented by HIV-positive patients, they are more
172 susceptible to the occurrence of reactivation or reinfection with *M. tuberculosis* [21].

173 The genotyping resulted in 36 different profiles of VNTR and 58.8% (40/68) of the
174 isolates were grouped into eight clusters, with a discriminatory power of 0.9478. This value
175 is lower than that found in previous studies in the same geographic region [22,23] and may
176 be due to the low genetic diversity and the high number of clusters [23], the low genetic
177 diversity was not expected, since previous studies in the same region, identified high
178 genetic diversity [24-26]. The unique exception was one study carried out in a penitentiary,
179 which showed low genetic diversity, more susceptible to contact with *M. tuberculosis* and
180 to development of disease [27].

181 The low genetic diversity found indicates the possibility of recent transmission of *M.*
182 *tuberculosis*, particularly in places with high clonal diversity. In this sense, the results
183 obtained by genotyping analysis associated with the epidemiological links proposed in this
184 study, permit to infer that the transmission of *M. tuberculosis* possibly occurred in the
185 nosocomial environment. This is strengthened by the fact that 90.6% of the patients
186 grouped in four major clusters formed, covering 80% of the patients in cluster, were
187 epidemiologically related, through simultaneous admission to the hospital.

188 In relation to the resistant *M. tuberculosis* strains, it was possible to observe that
189 62.5% (5/8) were in clusters. However, only the strains with resistance to INH and EMB or
190 monoresistant to EMB were grouped in the same cluster, all from HIV-positive patients.
191 Previous studies relate the occurrence of resistance combined with INH and EMB, to the
192 specific mutations in genes of *M. tuberculosis* or operons which confer phenotypes of
193 resistance to both drugs [28,29]. In addition, the existence of an efflux mechanism,
194 capable of extruding the two drugs, has been reported [30]. Except for the cluster number
195 4 that grouped three resistant strains, no relation between drugs susceptibility profile and

196 formation of clusters was identified. In addition, among the patients with resistant strains,
197 50% (4/8) had previous treatment for TB and were not grouped in clusters with other
198 resistant strains.

199 The early identification of cases of resistance to antimicrobial agents is important,
200 especially in contexts where HIV infection is common and the prevalence of TB is high,
201 since in those populations the risk of nosocomial transmission is amplified. The
202 transmission of resistant strains increases risks mainly for HIV-positive patients. For this
203 specific population, the resistance to drugs used in the treatment of TB can be lethal [31].

204 In hospital environments, the early identification of cases of TB and the potential
205 focus of the bacterial transmission are the key to understanding the impact of transmission
206 of *M. tuberculosis* [32,33], especially those with a high prevalence of patients with HIV
207 [34]. In this sense, our findings demonstrate that the genotyping of *M. tuberculosis* by 15
208 *loci* MIRU-VNTR is an important tool for the understanding of the dynamics of transmission
209 of *M. tuberculosis*.

210 In this study, the high rate of hospitalization, prolongation of stay, poor practices of
211 infection control, lack of physical barriers and the high prevalence of HIV infection, could
212 have contributed for nosocomial transmission with high rate of dissemination of *M.*
213 *tuberculosis* strains [2]. In places where health systems have inadequate hospital infection
214 control, as well inadequate isolation of TB patients and inability to rapid diagnose TB, the
215 time of hospitalization should be as short possible in order to reduce the exposure to other
216 patients [35]. Therefore, strategies for TB control must be implemented aiming better cure
217 rates and the prevention of *M. tuberculosis* transmission [2].

218 Among patients diagnosed with TB and grouped in cluster in this study, 60% had
219 positive results in the sputum smear microscopy. Between the HIV-positive patients in
220 cluster, 56.5% had positive results in the sputum smear microscopy. Indeed, bacilliferous
221 individuals are the main source of *M. tuberculosis* transmission and usually they are in a
222 more advanced stage of the disease, increasing the chances of occurrence of nosocomial
223 transmission [36]. This indicates that the measures of infection control recommended are
224 not yet well established in this hospital environment.

225 Our results have important implications for the TB control, especially in hospital
226 environments, which present patients with *M. tuberculosis* resistant strains and co-infected
227 by HIV. Finally, we emphasized that for effective control of the epidemic of TB, the
228 strengthening of programs to control for TB, the prevention, the fast diagnostic and the
229 effective treatment are fundamental.

REFERENCES

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. France: WHO, 2016.
- [2] Gandhi NR, Weissman D, Moodley P, Ramathal M, Elson I, Kreiswirth BN, et al. Nosocomial transmission of extensively drug-resistant tuberculosis in a rural hospital in South Africa. *J Infect Dis* 2013; 207(1): 9-17. doi: 10.1093/infdis/jjs631.
- [3] Jonsson J, Kan B, Berggren I, Bruchfeld J. Extensive nosocomial transmission of tuberculosis in a low-incidence country. *J Hosp Infect* 2013; 83(4): 321-6. doi: 10.1016/j.jhin.2012.11.028.
- [4] Miller AC, Polgreen LA, Cavanaugh JE, Hornick DB, Polgreen PM. Missed Opportunities to Diagnose Tuberculosis Are Common Among Hospitalized Patients and Patients Seen in Emergency Departments. *Open Forum Infect Dis* 2015; 2(4): ofv171. doi: 10.1093/ofid/ofv171.
- [5] Mekonnen F, Tessema B, Moges F, Gelaw A, Eshetie S, Kumera G. Multidrug resistant tuberculosis: prevalence and risk factors in districts of metema and west armachiho, Northwest Ethiopia. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 461. doi: 10.1186/s12879-015-1202-7.
- [6] Zignol M, Dean AS, Falzon D, van Gemert W, Wright A, van Deun A, et al. Twenty Years of Global Surveillance of Antituberculosis-Drug Resistance. *N Engl J Med* 2016; 375(11): 1081-9. doi: 10.1056/NEJMs1512438.
- [7] Niemann S, Supply P. Diversity and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: moving to whole-genome-based approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 4(12): a021188. doi: 10.1101/cshperspect.a021188.
- [8] Mears J, Abubakar I, Cohen T, McHugh TD, Sonnenberg P. Effect of study design and setting on tuberculosis clustering estimates using Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats (MIRU-VNTR): a systematic review. *BMJ Open* 2015; 5(1): e005636. doi: 10.1136/bmjopen-2014-005636.
- [9] Jagielski T, Minias A, van Ingen J, Rastogi N, Brzostek A, Żaczek A, et al. Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2016; 29(2): 239-90. doi: 10.1128/CMR.00055-15.
- [10] Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44(12): 4498-510.
- [11] Del Portillo P, Thomas MC, Martínez E, Marañón C, Valladares B, Patarroyo ME, et al. Multiprimer PCR system for differential identification of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1996; 34(2): 324-8.
- [12] Supply P. *Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of Mycobacterium tuberculosis: Technical Guide*. <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/files/MIRU-VNTRtypingmanualv6.pdf>; 2005 [accessed 12.12.16].

- [13] Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(8): 2720-2.
- [14] Martin A, Palomino JC. *Procedure Manual. Resazurin Microtiter Assay (REMA). Colorimetric assay. Drug susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis*. Belgium: Institute of Tropical Medicine, Mycobacteriology Unit Antwerp, 2009.
- [15] Cui Z, Wang J, Lu J, Huang X, Zheng R, Hu Z. Evaluation of Methods for Testing the Susceptibility of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates to Pyrazinamide. *J Clin Microbiol* 2013; 51(5): 1374-80. doi: 10.1128/JCM.03197-12.
- [16] Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51(5): 873-84.
- [17] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 26(11): 2465-6.
- [18] Kansime C, Kiwuwa SM, Levi M, Asiimwe BB, Katamba A. Health service delay among pulmonary tuberculosis patients presenting to a National Referral Hospital, Kampala, Uganda: a cross sectional study. *Pan Afr Med J* 2013; 15: 84. doi: 10.11604/pamj.2013.15.84.2692.
- [19] Masini EO, Mansour O, Speer CE, Addona V, Hanson CL, Sitienei JK, et al. Using Survival Analysis to Identify Risk Factors for Treatment Interruption among New and Retreatment Tuberculosis Patients in Kenya. *PLoS One* 2016; 11(10): e0164172. doi: 10.1371/journal.pone.0164172.
- [20] Mpagama SG, Lekule IA, Mbuya AW, Kisonga RM, Heysell SK. The Influence of Mining and Human Immunodeficiency Virus Infection among Patients Admitted for Retreatment of Tuberculosis in Northern Tanzania. *Am J Trop Med Hyg* 2015; 93(2): 212-5. doi: 10.4269/ajtmh.15-0189.
- [21] Crampin AC, Mwaungulu JN, Mwaungulu FD, Mwafulirwa DT, Munthali K, Floyd S, et al. Recurrent TB: relapse or reinfection? The effect of HIV in a general population cohort in Malawi. *AIDS* 2010; 24(3): 417-26. doi: 10.1097/QAD.0b013e32832f51cf.
- [22] Reis AJ, David SM, Nunes LS, Valim AR, Possuelo LG. Recent transmission of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a prison population in southern Brazil. *J Bras Pneumol* 2016; 42(4): 286-9. doi: 10.1590/S1806-37562016000000023.
- [23] Zamani S, Haeili M, Nasiri MJ, Imani Fooladi AA, Javadpour S, Feizabadi MM. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Hormozgan Province of Iran Based on 15-Locus MIRU-VNTR and Spoligotyping. *Int J Bacteriol* 2016; 2016: 7146470.
- [24] Von Groll A, Martin A, Felix C, Prata PF, Honscha G, Portaels F, et al. Fitness study of the RD^{Rio} lineage and Latin American-Mediterranean family of *Mycobacterium tuberculosis* in the city of Rio Grande, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 58(1): 119-27. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00611.x.

- [25] Soares RO, de Macedo MB, von Groll A, da Silva PE. *Mycobacterium tuberculosis* belonging to family LAM and sublineage RD^{Rio}: common strains in Southern Brazil for over 10 years. *Braz J Microbiol* 2014; 44(4): 1251-5.
- [26] Scholante Silva AB, Von Groll A, Félix C, Conceição FR, Spies FS, Scaini CJ, et al. Clonal diversity of *M. tuberculosis* isolated in a sea port city in Brazil. *Tuberculosis (Edinb)* 2009; 89(6): 443-7. doi: 10.1016/j.tube.2009.05.009.
- [27] Valença MS, Scaini JL, Abileira FS, Gonçalves CV, von Groll A, Silva PE. Prevalence of tuberculosis in prisons: risk factors and molecular epidemiology. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015; 19(10): 1182-7. doi: 10.5588/ijtld.15.0126.
- [28] Colangeli R, Helb D, Sridharan S, Sun J, Varma-Basil M, Hazbón MH, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* *iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. *Mol Microbiol* 2005; 55(6): 1829-40.
- [29] Parsons LM, Salfinger M, Clobridge A, Dormandy J, Mirabello L, Polletta VL, et al. Phenotypic and Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Resistant to both Isoniazid and Ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(6): 2218-25.
- [30] Srivastava S, Musuka S, Sherman C, Meek C, Leff R, Gumbo T. Efflux-pump-derived multiple drug resistance to ethambutol monotherapy in *Mycobacterium tuberculosis* and the pharmacokinetics and pharmacodynamics of ethambutol. *J Infect Dis* 2010; 201(8): 1225-31. doi: 10.1086/651377.
- [31] Bantubani N, Kabera G, Connolly C, Rustomjee R, Reddy T, Cohen T, et al. High Rates of Potentially Infectious Tuberculosis and Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB) among Hospital Inpatients in KwaZulu Natal, South Africa Indicate Risk of Nosocomial Transmission. *PLoS One* 2014; 9(3): e90868. doi: 10.1371/journal.pone.0090868.
- [32] Orenstein EW, Basu S, Shah NS, Andrews JR, Friedland GH, Moll AP, et al. Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2009; 9(3): 153-61. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70041-6.
- [33] Schwartz AB, Tamuhla N, Steenhoff AP, Nkakana K, Letlhogile R, Chadborn TR, et al. Outcomes in HIV-infected adults with tuberculosis at clinics with and without co-located HIV clinics in Botswana. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; 17(10): 1298-303. doi: 10.5588/ijtld.12.0861.
- [34] Basu S, Galvani A P. The evolution of tuberculosis virulence. *Bull Math Biol* 2009, 71(5): 1073-88. doi: 10.1007/s11538-009-9394-x.
- [35] Dharmadhikari A S. Six Degrees of Separation: Use of Social Network Analysis to Better Understand Outbreaks of Nosocomial Transmission of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *J Infect Dis* 2013; 207(1): 1-3. doi: 10.1093/infdis/jis634.
- [36] Jensen PA, Lambert LA, Iademaro MF, Ridzon R; CDC. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings. *MMWR Recomm Rep* 2005; 54(RR-17): 1-141.

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR (15): Categorical (1), Spoligo: Categorical (1), RD: Categorical (1), SNP: Categorical (1)

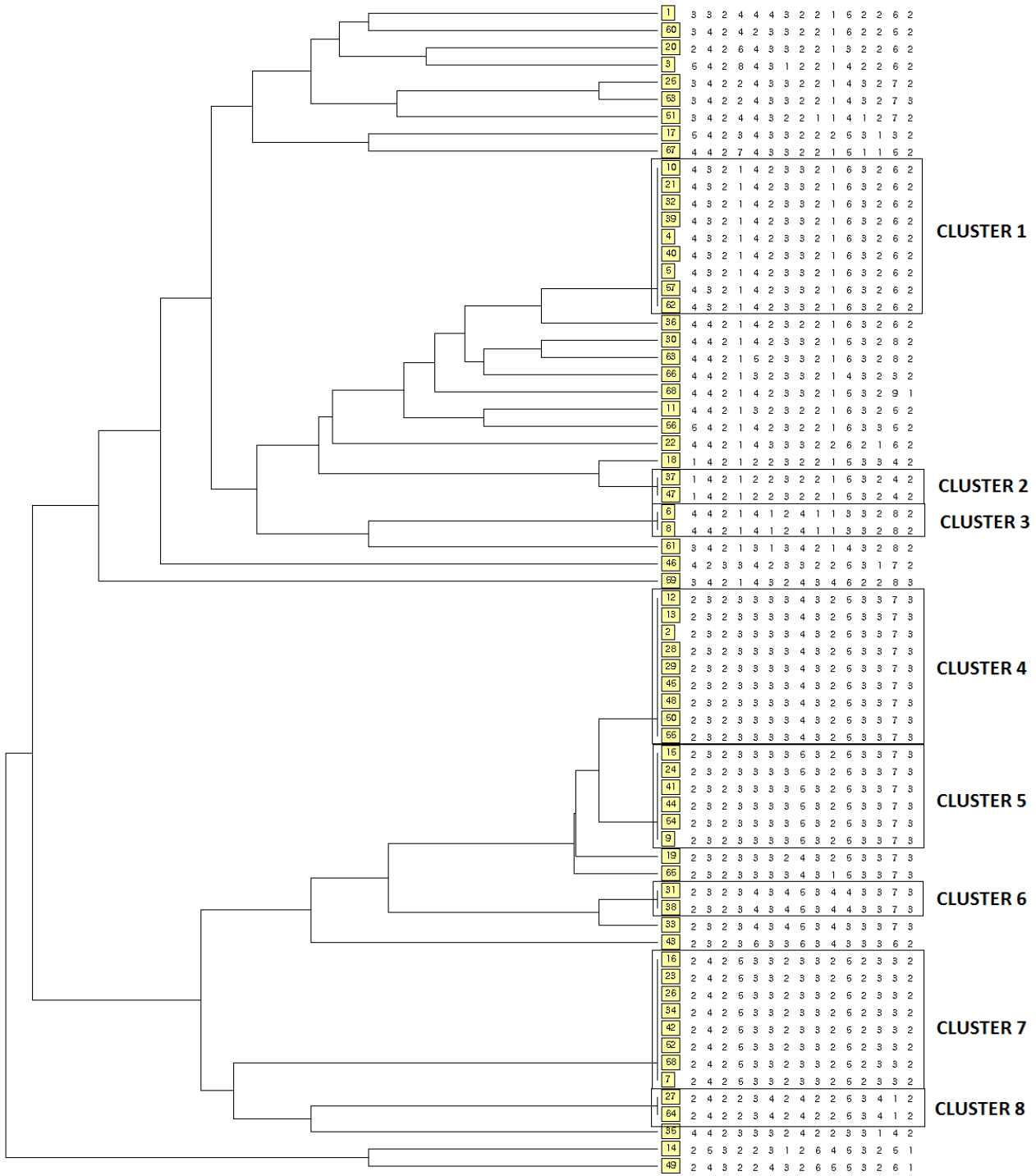


Figure 1: 15 loci MIRU-VNTR based dendrogram of 68 clinical isolates of *M. tuberculosis*. Cluster was considering when two or more samples showed the same genotypic profile.

Table 1: Allelic diversity using the 15 *loci* MIRU-VNTR

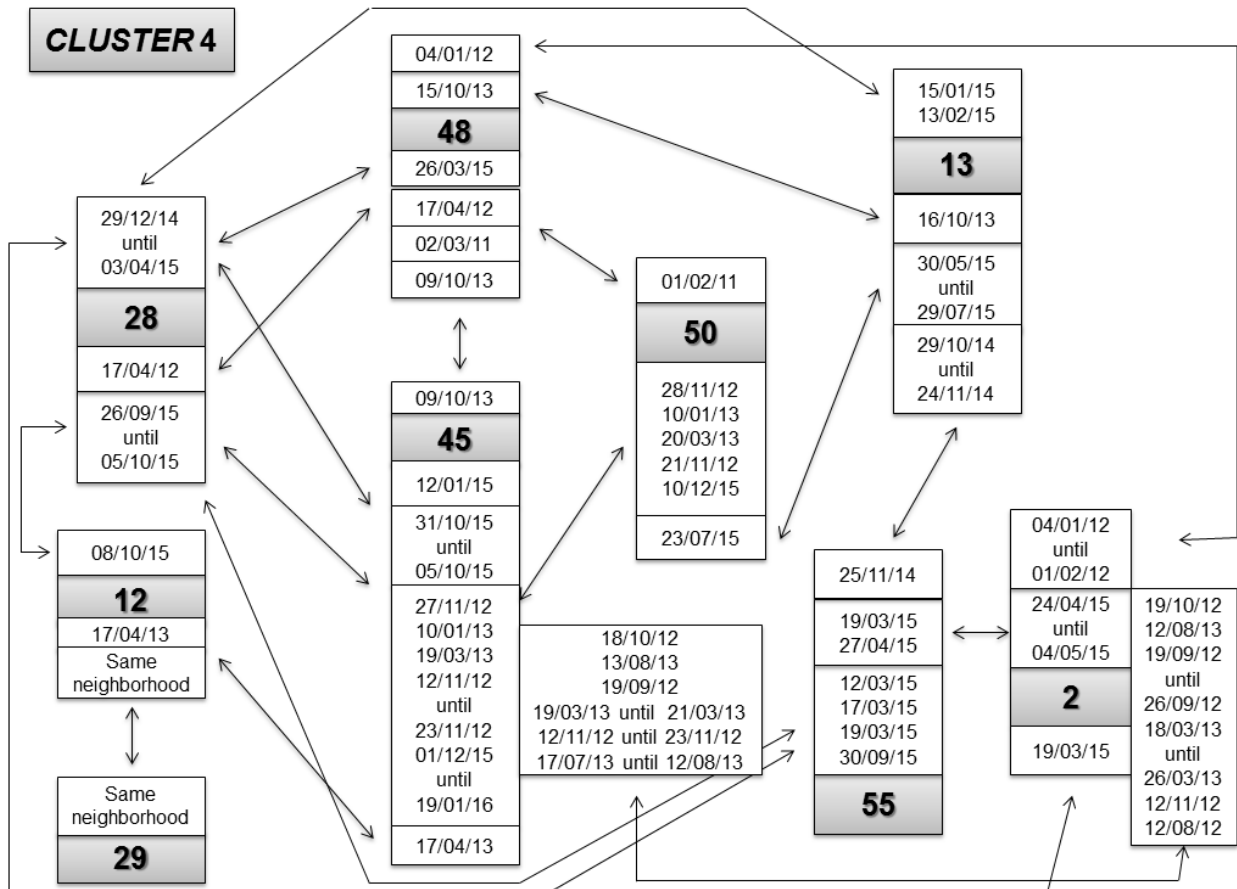
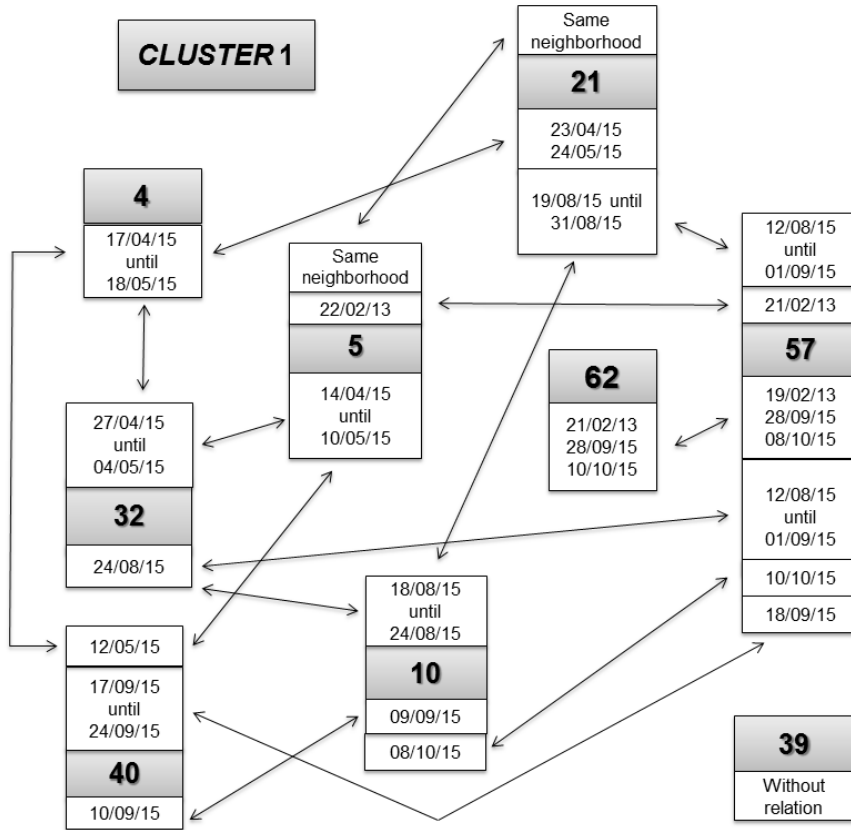
Alleles	MIRU 4	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 26	MIRU 31	MIRU 40	Mtub 4	Mtub 21	Mtub 30	Mtub 39	EtrA	EtrC	QUB 11b	QUB 26	QUB 4156
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	3	0	2	24	3	2	31	5	3	0	0	2	3
2	65	6	20	0	14	6	34	16	30	30	33	1	17	0	43
3	3	31	41	6	52	24	7	47	0	31	30	31	23	10	22
4	0	29	4	8	0	3	21	3	6	2	0	35	18	4	0
5	0	1	0	38	0	8	3	0	1	0	0	1	9	5	0
6	0	1	0	16	0	1	0	0	0	0	2	0	1	16	0
7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	24	0
8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	6	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Allelic diversity														
(h)	0.07	0.60	0.54	0.6	0.36	0.72	0.63	0.46	0.58	0.59	0.56	0.52	0.73	0.78	0.49
D*	Low	High	Medium	High	Medium	High	High	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	High	High	Medium

*D: highly discriminatory when $h \geq 0.6$; moderately discriminatory when $0.3 \geq h \leq 0.6$ and weakly discriminatory when $h \leq 0.3$.

Table 2: Clustered groups, HIV and epidemiological links

Cluster	Isolate's number	HIV	Epidemiological link
1	10, 62, 40, 5, 21, 57	POS	Hospital
	4	NI	
	32	NEG	
	5, 21		Same neighborhood
	39	NI	No link
2	37, 47	POS	No link
3	6**	NEG	No link
	8	POS	
4	29, 45, 50, 48, 55	POS	Hospital
	2, 13	NEG	
	28, 12	NI	
	29, 12	POS	Same neighborhood
5	15, 54, 44	POS	Hospital
	24, 9, 41	NI	
	54	POS	
	44, 24, 9		Same neighborhood
6	31***	NEG	No link
	38	POS	
7	7, 16, 26, 42	NI	Hospital
	23,	POS	
	34*, 52***	NEG	No link
	58*	POS	
8	27, 64*	POS	No link

*Patients with no data in the hospital system; **Patients from another hospital; ***Population deprived of liberty.



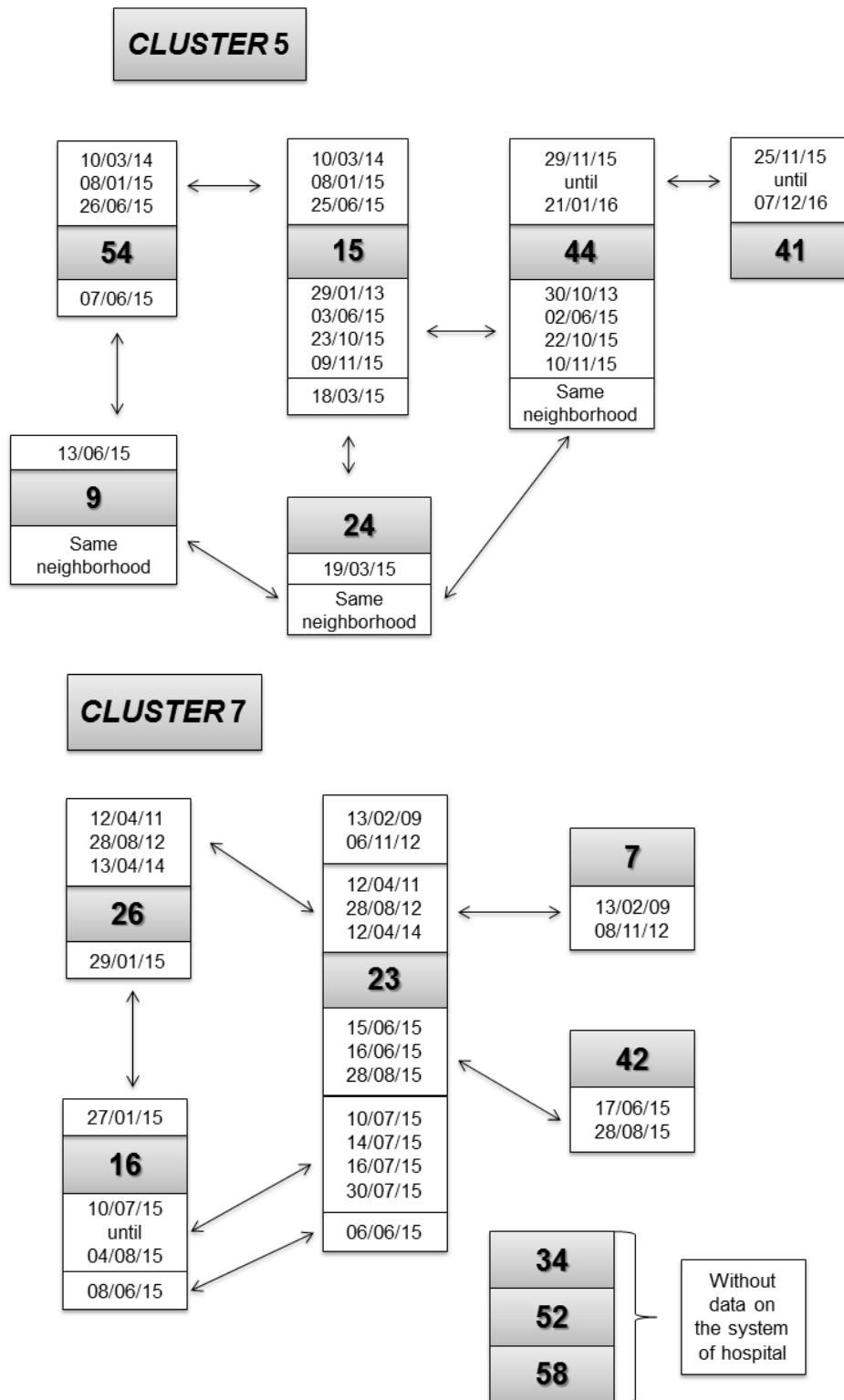


Figure 2: A flowchart of the connections between the clustered patients, whereas the dates for consultations, exams and admissions. The arrows indicate the dates on which the patients were in the hospital during the same period, that is, until two days of difference between the dates, due to the long time of viability of *M. tuberculosis*.

Table 3: Profile of resistance to drugs, related to genetic patterns and epidemiological data.

Sample	Genetic pattern	Drug resistance	HIV result	Previous treatment for TB
59	Not clustered	INH, RIF	Neg	PT*
35	Not clustered	RIF	NI	PT
33	Not clustered	SM	Pos	NI
29	Cluster 4	INH, EMB	Pos	Not PT
50	Cluster 4	INH, EMB	Pos	Not PT
45	Cluster 4	EMB	Pos	PT
15	Cluster 5	INH, RIF	Pos	NI
34	Cluster 7	INH	Neg	PT

NI: not informed; Pos: Positive; Neg: Negative. INH: isoniazid; RIF: rifampicin; EMB: ethambutol; SM: streptomycin; PT: previously treated.

1 **5 CONCLUSÕES**

2

3 Com o exposto ao longo do presente estudo, pode-se concluir que:

4 1) A incidência de TB foi de 20%.

5 2) 54,7% dos pacientes eram HIV positivos, 64% eram do sexo masculino,
6 com média de idade de 39 anos.

7 3) O TMR mostrou melhores resultados de sensibilidade, VPP, VPN e
8 precisão, inclusive para amostras extrapulmonares.

9 4) 58,8% (40/68) das cepas foram agrupadas em cluster.

10 5) 11,8% (8/68) das cepas foram resistentes a pelo menos um dos quatro
11 fármacos testados.

12 6) 37,5% (3/8) das cepas com resistência aos medicamentos foram
13 agrupadas em um mesmo cluster.

14 7) A ocorrência de possível transmissão nosocomial entre os pacientes
15 diagnosticados com TB foi verificada.

1 **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2

3 Existe a necessidade de implementação de medidas para o controle da TB,
4 como por exemplo, o diagnóstico rápido, o uso de máscaras de proteção
5 respiratória, o reduzido tempo de internação, a ventilação melhorada, os testes
6 rápidos de susceptibilidade aos fármacos, o tratamento para o HIV e o isolamento de
7 pacientes com suspeita ou com diagnóstico de TB. Assim é garantida a prevenção
8 da transmissão do *M. tuberculosis*, especialmente em ambientes hospitalares. Neste
9 sentido, o TMR surge como uma ferramenta importante para o controle da TB,
10 devido a sua rapidez e alta especificidade e sensibilidade, demonstrando a
11 importância da participação efetiva do laboratório junto ao controle da doença.

12 Embora a implementação destas medidas preventivas aumente os custos
13 para os sistemas de saúde em um curto espaço de tempo, a falta de controle
14 adequado gera graves consequências, refletindo diretamente em altas taxas de
15 transmissão nosocomial.

ANEXOS

ANEXO A: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Área da Saúde – FURG.



CEPAS/FURG
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NA ÁREA DA SAÚDE
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
www.cepas.furg.br

PARECER N° 128/2016

CEPAS 64/2016

Processo: 23116.007340/2016-35
CAAE: 59633816.1.0000.5324

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO DE FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS DE TUBERCULOSE EM UM LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA NO EXTREMO SUL DO BRASIL

Pesquisador Responsável: Pedro Eduardo Almeida da Silva

PARECER DO CEPAS:


O Comitê, considerando tratar-se de um trabalho relevante, o que justifica seu desenvolvimento, bem como o atendimento à pendência informada no parecer 117/2016, emitiu o parecer de **APROVADO** para o projeto "**COMPARAÇÃO DE FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS DE TUBERCULOSE EM UM LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA NO EXTREMO SUL DO BRASIL**".

Está em vigor, desde 15 de novembro de 2010, a Deliberação da CONEP que compromete o pesquisador responsável, após a aprovação do projeto, a obter a autorização da instituição coparticipante e anexá-la ao protocolo do projeto no CEPAS. Pelo exposto, o pesquisador responsável deverá verificar se seu projeto está obedecendo a referida deliberação da CONEP.

Segundo normas da CONEP, deve ser enviado relatório **final** de acompanhamento ao Comitê de Ética em Pesquisa, conforme modelo disponível na página

Data de envio do **relatório final**: 28/02/2017.

Rio Grande, RS, 05 de outubro de 2016.


Profª. Eli Sinnott Silva

Coordenadora do CEPAS/FURG