

Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas

DISSERTAÇÃO

IMPACTO DO TESTE XPERT MTB/RIF NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE

Giovana Rodrigues Pereira

Porto Alegre, 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas

Impacto do Teste XPERT MTB/RIF no Diagnóstico da Tuberculose

Giovana Rodrigues Pereira

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Pneumológicas, à Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Pneumológicas

Orientadora: Prof^ª. Dra. Denise Rossato Silva

Porto Alegre, 2018

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

CIP - Catalogação na Publicação

PEREIRA, GIOVANA RODRIGUES
IMPACTO DO TESTE XPERT MTB/RIF NO DIAGNÓSTICO DA
TUBERCULOSE / GIOVANA RODRIGUES PEREIRA. -- 2018.
53 f.
Orientador: DENISE ROSSATO SILVA.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2018.

1. TUBERCULOSE. 2. GENE XPERT MTB. I. SILVA,
DENISE ROSSATO, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aqueles que me amam: Família, Amor e Amigos.

AGRADECIMENTOS

À professora Denise Rossato Silva pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Ao acadêmico de Farmácia da UFCSPA, Natan J. D. Dias com quem partilhei o que era o broto daquilo que veio a ser esse trabalho e que contribuiu para tal realização.

Aos colegas do Laboratório Municipal de Alvorada pela compreensão, pelo convívio e pela força.

Ao Setor de Tisiologia e a Secretaria de Saúde de Alvorada pelo apoio.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1 Tuberculose.....	18
1.1.1 Definição	18
1.1.2 Epidemiologia.....	19
1.1.2.1 Epidemiologia no Mundo	19
1.1.2.2 Epidemiologia no Brasil	19
1.1.2.3 Epidemiologia no Rio Grande do Sul E Porto Alegre	21
1.1.3 Patogênese	21
1.1.4 Diagnóstico da Tuberculose.....	23
1.1.4.1 Sinais e Sintomas.....	23
1.1.4.2 Diagnóstico Radiológico	25
1.1.4.3 Diagnóstico Microbiológico	26
1.1.4.3.1 Baciloscopia	26
1.1.4.3.2 Cultura	26
1.1.4.3.3 Xpert MTB/RIF	28
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Geral	32
3.2 Específicos.....	32
4 REFERÊNCIAS	33
5 ARTIGO CIENTÍFICO	39

5.1 Title: Impact of Introduction of Xpert Mtb/Rif Test on Tuberculosis (Tb) Diagnosis in a City With High tb Incidence in Brazil.....	39
6 CONCLUSÕES.....	54
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Coeficiente de incidência de tuberculose, Brasil 2007 a 2016.....	20
Figura 2 – Coeficiente de mortalidade por tuberculose, Brasil, 2005 a 2015	20
Figure 1. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve for the Detection of Tuberculosis with Xpert MTB/RIF test (The area under the ROC curve was 0.95 for the Xpert MTB/RIF test [95% CI 0.93 to 0.97; $p < 0.0001$]).	47

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Sensibilidade e Especificidade para o teste Xpert® MTB/RIF agrupados segundo diagnóstico bacteriológico (baciloscopia e cultura) e clínico.....	17
--	----

LISTA DE TABELA

Table 1. Characteristics of study patients.46

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR= Bacilo Álcool-Ácido Resistente

BK= Bacilo de Koch

DNA= Ácido desoxirribonucleico

HIV= Vírus da imunodeficiência adquirida

MDR= Multidroga resistente

Mtb = *Mycobacterium tuberculosis*

PCR= *Polimerase Chain Reaction*

TB= Tuberculose

TPBN= Tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa

RESUMO

Introdução: O teste Xpert MTB / RIF está sendo cada vez mais utilizado em muitos países como diagnóstico inicial para a tuberculose (TB). Poucos estudos avaliaram o impacto do Xpert no diagnóstico em rotinas de programas de controle de TB no Brasil. O objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto da introdução do Xpert MTB / RIF no diagnóstico de TB em uma cidade com alta incidência de TB no Brasil. **Métodos:** Incluímos pacientes avaliados com testes diagnósticos convencionais durante um ano antes da introdução do Xpert (grupo pré-Xpert) e pacientes avaliados usando Xpert durante um ano após a introdução do teste (grupo pós-Xpert). **Resultados:** 620 pacientes preencheram os critérios de inclusão (208 no grupo pré-Xpert e 412 no grupo pós-Xpert) e foram incluídos na análise. O tempo até o diagnóstico de TB foi menor no grupo pós-Xpert (0,7 dias, IQR: 0,5-1,0 dias) do que no grupo pré-Xpert (2,0 dias, IQR: 2,0-2,0 dias) ($p < 0,0001$). Características atípicas da doença, como menor perda de peso, febre, dispneia, sudorese noturna e hemoptise; baciloscopia de escarro negativa; cultura negativa e radiografia de tórax atípica de TB foram mais comuns no grupo pós-Xpert do que no grupo pré-Xpert ($p < 0,0001$ para todos). **Conclusões:** Observamos que a implementação do ensaio Xpert MTB / RIF, em rotinas de programas de controle de TB, melhora e facilita o diagnóstico de tuberculose, especialmente nos casos com manifestações da doença atípica. Esses resultados podem provavelmente ser generalizados para locais com incidência de TB similar.

Palavras-chave: tuberculose; diagnóstico; Xpert MTB/ RIF; tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa

ABSTRACT

Introduction: The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is expressed in normal lungs and is upregulated during inflammation and infection. The interaction between AGEs and RAGE on the plasma membrane causes oxidative stress and apoptosis in lung cells. The objective of this study is to evaluate plasma levels of AGEs and its soluble receptor (sRAGE) in patients with active TB and healthy controls, and to investigate their relationship with food intake and nutritional status. **Methods:** Case-control study. AGE (carboxymethyl lysine, CML) and RAGE were measured by Elisa. Nutritional assessment was performed by body mass index, triceps skin-fold thickness, mid-arm circumference, mid-arm muscle circumference, bioelectrical impedance analysis, and food frequency questionnaire. **Results:** 35 TB patients and 35 controls were included in the study. The mean S-RAGE levels were higher in TB patients than in controls (68.5 ± 28.1 vs 57.5 ± 24.0 , $p=0.046$). Among cases that were current smokers, lower S-RAGE levels were associated with mortality (S-RAGE levels= 58.0 ± 36.5 [non-survivors] vs 71.3 ± 25.6 [survivors], $p=0.006$), and with weight loss (S-RAGE levels= 65.6 ± 27.4 [weight loss] vs 98.6 ± 16.7 [no weight loss], $p=0.034$). There was no statistically significant difference in CML levels and diet CML content between cases and controls. Malnutrition was more frequent in cases than in controls, but there was no correlation between nutritional parameters and CML or S-RAGE levels. **Conclusions:** TB patients had higher S-RAGE levels than controls. S-RAGE may play a role in disease manifestations and outcomes, being associated with weight loss and mortality.

Keywords: tuberculosis; diagnosis; Xpert MTB/RIF; smear-negative pulmonary tuberculosis

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é um importante problema de saúde pública no mundo, particularmente em países de baixa e média renda. Estima-se que um terço da população mundial está infectado pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Em 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) iniciou o segundo ano da campanha global '*Unidos para Acabar com a Tuberculose*' (*United to End TB*), uma das dez maiores causas de morte em todo o mundo, com 10 milhões de novos casos notificados por ano, levando mais de um milhão de pessoas a óbito. Nos últimos anos, a preocupação com esses números elevados fez com que a OMS redefinisse a classificação de países prioritários para o período de 2016 a 2020. Três são as listas prioritárias, definidas segundo os critérios epidemiológicos: carga de TB; TB multidroga resistente (MDR); e coinfeção TB/HIV. O Brasil, que ainda permanece entre os 20 países que apresentam mais casos da doença, encontra-se em duas dessas listas, ocupando a 20ª posição na classificação de carga da doença e a 19ª quanto à coinfeção TB/HIV. Em 2016, foram registrados 69,5 mil casos novos de TB no Brasil. No período de 2007 a 2016, o coeficiente de incidência da doença apresentou uma variação média anual de 1,2%, passando de 37,9/100 mil habitantes, em 2007, para 33,7/100 mil habitantes em 2016. Porto Alegre é a capital brasileira com o 4º maior número de casos de TB, com uma incidência de 80,4 casos/100.000 habitantes e uma taxa de coinfeção TB-HIV de 25,1%.

Para o diagnóstico da TB, a OMS preconiza que seja utilizada inicialmente a baciloscopia de escarro. A pesquisa do bacilo álcool-ácido-resistente (baciloscopia) é um método de baixo custo e amplamente utilizado em todo o mundo para o diagnóstico da TB. Entretanto, essa não é uma técnica sensível, e somente 57% dos novos casos de TB pulmonar notificados têm baciloscopia positiva. A sensibilidade da baciloscopia varia de 40 a 80%, dependendo de fatores como o tipo de lesão, o tipo e número de amostras, a atenção e a

persistência do microscopista e a presença de coinfeção com HIV. O número mínimo de bacilos necessários para produzir um esfregaço com resultado positivo tem sido estimado entre 5.000 a 10.000 por mililitro, o que acarreta uma grande probabilidade da ocorrência de resultados falso-negativos. A negatividade desse método diagnóstico pode ser influenciada tanto pelo estágio inicial da doença, tendo em vista que o bacilo apresenta reprodução lenta, quanto pela imunidade do indivíduo, que pode manter os níveis de infecção sob controle.

A cultura para micobactérias tem rendimento diagnóstico superior ao da baciloscopia direta no escarro, porém, por ser consideravelmente mais demorada em seus resultados - cerca de duas a oito semanas - não é utilizada na rotina diária de atendimento dos casos e para a tomada de decisão terapêutica. Dessa forma, muitas vezes o tratamento é realizado empiricamente baseado em critérios clínico-radiológicos e pode resultar em custos e toxicidades desnecessários.

A TB pulmonar com baciloscopia negativa (TPBN) representa 30-60% dos casos de TB, conforme a região. No Brasil, 24% a 30% dos casos de TB pulmonar entre os adultos são TPBN. A mortalidade desses pacientes pode chegar até 25% em populações com alta prevalência de infecção pelo HIV, o que pode ser em grande parte consequência do atraso no diagnóstico. Além disso, embora os pacientes com baciloscopia positiva sejam considerados mais infectantes, 10-20% das transmissões de TB em nível populacional são atribuíveis a casos de TPBN.

Considerando-se a demora nos resultados da cultura, o uso de testes diagnósticos mais rápidos, que pudessem autorizar o início do tratamento antes do resultado da cultura, seria extremamente útil. A reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction-PCR) é uma técnica de amplificação do ácido desoxirribonucleico (DNA) da célula que pode detectar menos de um fragmento do bacilo de Koch, sendo um método rápido e confiável para o diagnóstico da TB. Embora tenha alta especificidade, a sensibilidade tem uma ampla variação, de 36% a 97%, dependendo dos resultados da baciloscopia e cultura.

O Xpert MTB/RIF é um PCR em tempo real, totalmente automatizado, que detecta o bacilo *M. tuberculosis* e a resistência à rifampicina em menos de duas horas, com sensibilidade de 95% e especificidade de 98% em amostras com baciloscopia positiva. O teste consiste na purificação, concentração e amplificação de ácidos nucléicos por PCR em tempo real e na identificação de sequências de ácidos nucléicos no genoma TB (*M. tuberculosis*), especificamente do gene *rpoβ*. A diferença deste para os demais testes de amplificação de ácidos nucléicos utilizados na detecção de TB é que a plataforma do dispositivo do teste integra e automatiza os três processos (preparação de amostras, amplificação e detecção), necessários para a PCR em tempo real baseada em testes moleculares.

O Xpert MTB/RIF detecta simultaneamente *M. tuberculosis* e a resistência à rifampicina pela amplificação, por meio de PCR, de cinco sondas sobrepostas que são complementares à região determinante da resistência à rifampicina, composta por 81 pares de bases do gene *rpoβ* de *M. tuberculosis*. Em seguida, esta região é examinada com o objetivo de identificar mutações associadas à resistência à rifampicina. O processo de amplificação por PCR, neste teste, é *heminested* e o alvo amplificado é detectado em tempo real por fluorescência. Neste processo, dois conjuntos de *primers* são utilizados em duas reações sucessivas. Na primeira PCR, um par de *primers* é usado para gerar produtos de DNA, que podem conter produtos amplificados a partir de áreas não-alvo. Os produtos da primeira PCR são, então, usados como modelo em uma segunda PCR, usando um *primer* diferente, cujo sítio de ligação esteja localizado dentro do primeiro produto amplificado, conseqüentemente, aumentando a especificidade da reação.

Em dezembro de 2010, a OMS endossou o uso do Xpert MTB/RIF em países de alta carga de TB, considerando-o uma tecnologia capaz de revolucionar o diagnóstico e o tratamento da doença. Evidências clínicas existentes sobre a acurácia e a efetividade do teste Xpert MTB/RIF no diagnóstico da TB pulmonar são provenientes de sete estudos clínicos isolados,

publicados em 2010 e 2011. As principais características e resultados dos estudos estão contidos no Quadro 1.

Quadro 1 - Sensibilidade e Especificidade para o teste Xpert® MTB/RIF agrupados segundo diagnóstico bacteriológico (baciloscopia e cultura) e clínico.

Resultado Bacteriológico	Estudo	Sensibilidade Xpert® MTB/RIF (IC 95%)	Resultado Bacteriológico e Clínico	Estudo	Especificidade Xpert® MTB/RIF (IC 95%)
Baciloscopia + / Cultura +	Boehme <i>et. al.</i> , 2011	98,3% (97,0-99,0%)	Cultura- / Exame Clínico -	Boehme <i>et. al.</i> , 2011	99,0% (98,5 – 99,3%)
	Rachow A. <i>et. al.</i> , 2011	98,0% (89,6-100%)		Rachow A. <i>et. al.</i> , (2011)	99,0% (94,7 - 100%)
	Marlowe <i>et. al.</i> , 2011	98%	Cultura- / Exame Clínico +	Rachow A. <i>et. al.</i> , (2011)	90,9%
	Helb <i>et. al.</i> , 2010	100% (85,4-100%)			
	Armand <i>et. al.</i> , 2011	100%	Baciloscopia - / Cultura -	Moure <i>et. al.</i> , 2011	100%
Baciloscopia - / Cultura +	Boehme <i>et. al.</i> , 2011	76,9% (72,4-80,8%)	Cultura -	Helb <i>et. al.</i> , 2010	100% (83,4 – 100%)
	Rachow A. <i>et. al.</i> , (2011)	61,1% (35,7-82,7%)		Marlowe <i>et. al.</i> , 2011	95%
	Marlowe <i>et. al.</i> , 2011	72%		Helb <i>et. al.</i> , 2010	100% (65,6 – 100%)
	Moure <i>et. al.</i> , 2011	78,2%		Ioannidis <i>et. al.</i> , 2011	94,3% (80,8% - 99,1%)
	Helb <i>et. al.</i> , 2010	71,7% (57,4-82,8%)		Armand <i>et. al.</i> , 2011	100%
	Armand <i>et. al.</i> , 2011	57%			

Embora a TB multidroga-resistente (MDR) represente menos de 2% dos casos de TB no Brasil, o controle da TB-MDR permanece um grande desafio devido às dificuldades no diagnóstico e tratamento. O atraso na obtenção de resultados laboratoriais também é uma barreira para o controle da TB-MDR.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Tuberculose

1.1.1 Definição

A TB é uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *M. tuberculosis*, que é uma bactéria aeróbia que acomete, principalmente, os pulmões. Este microrganismo tem como principal porta de entrada no organismo as vias aéreas, e ao chegar aos alvéolos pulmonares é fagocitado por macrófagos, o que desencadeia um processo inflamatório, pois se multiplica no interior dos macrófagos e determina a evolução da doença (23).

Há décadas a TB assola a humanidade, representando uma elevada morbidade e mortalidade ao nível mundial. Apesar dos intensos esforços da OMS desde 2001, com o lançamento do ‘*The Global Plan to Stop TB*’ 2001–2005, a TB continua a constituir um grave problema de Saúde Pública, com importantes implicações para os serviços de saúde, para as famílias dos afetados e na economia, permanecendo uma das mais mortais doenças infecciosas. Em países de rendimento médio ou baixo é sustentada pela pobreza, aumento da população e da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (24).

1.1.2 Epidemiologia

1.1.2.1 Epidemiologia no Mundo

A OMS aponta que, no mundo, 10,4 milhões de pessoas foram infectadas pela TB em 2015, e mais de 1 milhão morreram por conta da doença. Esses resultados configuram a TB como um grave problema de saúde pública, salientando-se que a OMS a reconhece como a doença infecciosa de maior mortalidade no mundo, superando o HIV e a malária juntos. No mundo, em 2015, a TB foi a doença infecciosa que mais causou mortes.

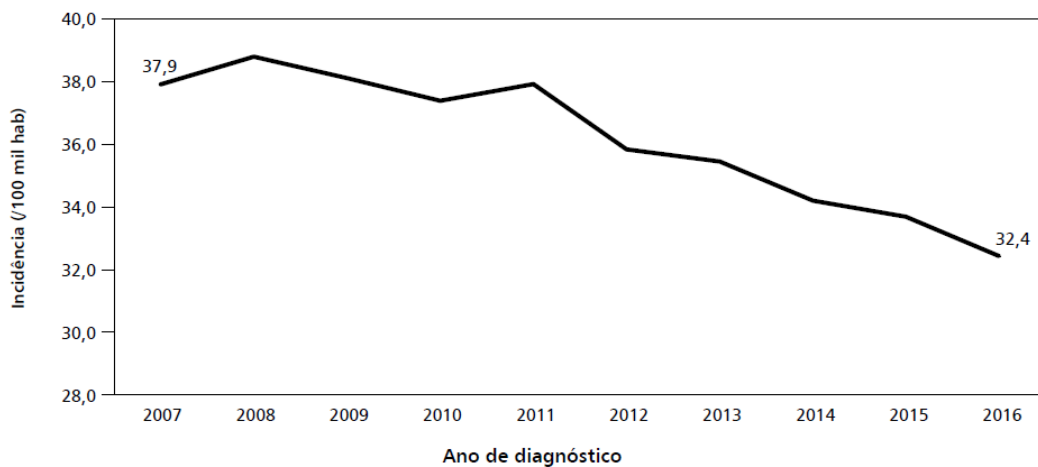
Em 2014, durante a Assembleia Mundial de Saúde, ocorreu aprovação de uma nova estratégia global para enfrentamento da doença, com metas para acabar com a TB como um problema de saúde pública até o ano de 2035, o que representa o alcance de um coeficiente de incidência menor que 10/100 mil habitantes. Trata-se da Estratégia pelo Fim da Tuberculose, que tem como visão “Um mundo livre da tuberculose” (1).

1.1.2.2 Epidemiologia no Brasil

Em 2016, foram diagnosticados e registrados 66.796 casos novos e 12.809 casos de retratamento de TB no Brasil. No período de 2007 a 2016, o coeficiente de incidência da doença apresentou uma variação média anual de -1,7%, passando de 37,9/100 mil hab. em 2007 para 32,4/100 mil hab. em 2016 (Figura 1).

O coeficiente de mortalidade por TB no Brasil apresentou redução de 15,4% no período de 2006 a 2015, passando de 2,6/100 mil hab. Para 2,2/100 mil hab. (Figura 2) (2).

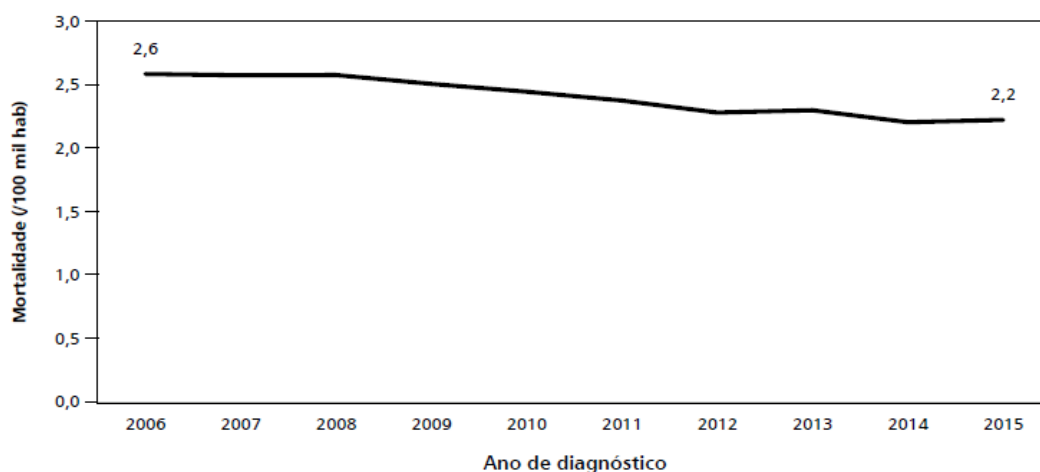
Figura 1 – Coeficiente de incidência de tuberculose, Brasil 2007 a 2016



Fonte: SES/MS/Sinan e IBGE. Base de dados gerada em fevereiro de 2017.
*Dados sujeitos a alteração.

O coeficiente de mortalidade por TB no Brasil apresentou redução de 15,4% no período de 2006 a 2015, passando de 2,6/100 mil hab. Para 2,2/100 mil hab. (Figura 2) (2).

Figura 2 – Coeficiente de mortalidade por tuberculose, Brasil, 2005 a 2015



Fonte: SIM/SVS/MS e IBGE.
*Dados sujeitos a alteração.

1.1.2.3 Epidemiologia no Rio Grande do Sul E Porto Alegre

O Rio Grande do Sul possui 15 municípios prioritários para o enfrentamento da TB, nos quais a carga da doença em termos de taxa de incidência é maior: Alvorada, Cachoeirinha, Canoas, Gravataí, Guaíba, Novo Hamburgo, Pelotas, Porto Alegre, Rio Grande, Santa Cruz do Sul, Santa Maria, São Leopoldo, Sapucaia do Sul, Uruguaiana e Viamão (25).

Dentre as 26 Unidades Federativas e Distrito Federal o Rio Grande do Sul é 5º estado brasileiro em coeficiente de incidência apresentando 37,5/100 mil hab. em 2016, sendo Porto Alegre a 4ª capital brasileira com 80,4/100 mil hab.

As taxas de cura de TB pulmonar bacilífera (aquela que é contagiosa, causando a disseminação da doença na população), estão entre as menores do Brasil (em 2016, a taxa foi de 63,4%, valores que colocam o Estado como o penúltimo colocado em cura) (2).

1.1.3 Patogênese

A TB é transmitida através de aerossóis contendo *M. tuberculosis* provenientes de uma pessoa infectada. Os aerossóis mantêm-se na atmosfera por várias horas depois de gerados (26).

Quando inalados, a maioria dos bacilos são retidos pelas barreiras físicas de defesa do corpo que promove a exclusão das partículas para o exterior. Contudo, algumas bactérias não são retidas, sendo aspiradas para o interior do pulmão. Uma vez no pulmão, os bacilos são rapidamente detectados e fagocitados por macrófagos alveolares e provavelmente por células dendríticas (27).

Durante este processo, os macrófagos alveolares secretam citocinas e quimiocinas induzindo uma resposta inflamatória local e a migração de monócitos da corrente sanguínea para o local de infecção (28).

A apresentação de antígenos de *M. tuberculosis* por células dendríticas a linfócitos T nos nódulos linfáticos induz a migração dos linfócitos para o local de infecção induzindo a formação do granuloma. Em alguns casos, os bacilos podem disseminar-se antes da formação os granulomas através do sistema linfático ou circulatório para outras partes do pulmão ou órgãos do corpo durante os estágios iniciais da doença.

Nos granulomas, os macrófagos são ativados pelos linfócitos T através da produção de interferon (IFN)- γ e o fator de necrose tumoral (TNF)- α . Estas citocinas têm por função conter o *M. tuberculosis* no granuloma. Esta estrutura é caracterizada por níveis baixos de oxigênio, pH e nutrientes, restringindo o crescimento do bacilo da TB e estabelecendo latência. Os granulomas podem persistir durante anos e conter eficientemente o patógeno enquanto o indivíduo se mantiver imunocompetente. Geralmente, 90% dos indivíduos infectados, controlam com sucesso a infecção, de forma assintomática, sendo os bacilos contidos num estado dormente no interior do granuloma: TB latente. Nos casos de TB latente, o controle desta infecção crônica resulta de um equilíbrio permanente entre o hospedeiro e a micobactéria. Contudo, cerca de 5% dos indivíduos desenvolvem doença primária progressiva severa e potencialmente fatal. Os mecanismos que determinam a progressão da doença não são totalmente conhecidos, mas parecem estar relacionados com fatores ambientais e socioeconômicos (exposição ao *M. tuberculosis*, alta densidade populacional), fatores do hospedeiro (subnutrição, predisposição genética), assim como fatores do *M. tuberculosis* (variação genética, fatores de virulência) (29).

Adicionalmente, num pequeno número de indivíduos (cerca de 5%) com infecção latente, alterações no sistema imune devido ao envelhecimento, subnutrição, medicação imunossupressora ou infecção pelo HIV, ocorre reativação ou TB secundária. O granuloma perde a sua estrutura deixando de conter as bactérias viáveis, o que conduz à sua replicação e à disseminação da doença (reativação da TB) (30).

Nestes casos, o sistema imune é incapaz de conter a infecção, o centro caseoso liquidifica, levando à formação de uma cavidade. Os macrófagos não sobrevivem nestas lesões, sendo ineficazes no controle da multiplicação das bactérias, agora também com uma localização extracelular. Nesta fase, o bacilo pode atingir números muito elevados, sendo bem conhecido o elevado risco de contágio na TB pulmonar cavitária (31).

Os linfócitos T CD8+ localizam-se na periferia do granuloma. Estes, tal como alguns linfócitos T CD4+ com capacidades citolíticas, são capazes de lisar os macrófagos infectados, libertando o *M. tuberculosis*, agora disponível para ser fagocitado por outros macrófagos. Este processo pode resultar na liberação de bactérias para a corrente sanguínea, originando focos de infecção à distância em vários órgãos, ou as bactérias podem ser liberadas para as vias aéreas onde podem ser expulsas dos pulmões e infectar outros indivíduos.

1.1.4 Diagnóstico da Tuberculose

1.1.4.1 Sinais e Sintomas

Os principais sintomas e sinais da TB, também chamados de “marcadores clínicos da TB” estão citados abaixo:

- Tosse
- Expectoração
- Febre vespertina
- Sudorese noturna abundante
- Emagrecimento acentuado
- Fraqueza

- Anorexia
- Hemoptise
- Dor torácica moderada
- Evolução não aguda
- Imunodepressão por qualquer causa, alcoolismo ou
- Diabetes
- Contato recente com caso bacilífero
- História de TB

O *M. tuberculosis* se multiplica a cada 12-20 h, e os sintomas da TB iniciam lentamente. Muitas vezes, o doente só se convence de que está enfermo de 30 a 60 dias depois dos sintomas iniciais, quando o escarro já se tornou bacilífero e já houve tempo de contaminar outras pessoas, fechando o ciclo epidemiológico de transmissão. Essa é uma característica importante da TB (32).

A tosse, que perdura por mais de duas semanas, é o sintoma mais precoce da TB pulmonar, mas geralmente o leigo não associa esse sintoma e a expectoração que surge a seguir com a doença e, raramente, procura uma unidade de saúde no início dos sintomas, que são atribuídos a uma gripe mal curada, a bronquite tabágica ou a outra situação clínica qualquer (33). Apenas quando surgem outros sintomas é que ocorre a necessidade de obter auxílio médico (busca passiva), o que aumenta muito o tempo entre o primeiro sintoma e o diagnóstico da doença (34). A busca ativa, realizada principalmente por agentes do Programa de Saúde da Família em comunidades com alta prevalência de TB, se baseia na identificação de tosse com as características já citadas, que classifica o doente como “sintomático respiratório” (35).

1.1.4.2 Diagnóstico Radiológico

Imagens torácicas visualizadas por radiografia convencional, ultrassonografia, tomografia computadorizada, imagem de ressonância magnética e tomografia computadorizada PET com alterações podem levar a suspeita de TB (36).

Geralmente, o método de escolha é a radiografia convencional. A TB pulmonar em adultos geralmente apresenta infiltrado focal nos lobos superiores, frequentemente dos segmentos apical e posterior ou do segmento apical do lobo inferior. Outras alterações que podem ser encontradas são cavitações, padrão miliar, adenopatias, derrame pleural e atelectasias (37,38).

Na TB primária, a radiografia pode ser normal, contudo pequenos nódulos periféricos podem estar presentes, mas não serem visualizados. A alteração mais comum na forma primária da TB é linfonomegalia mediastinal, com incidência maior em crianças do que em adultos, enquanto a atelectasia obstrutiva ocorre com menos frequência. A TB miliar é caracterizada por opacidades reticulo-micronodulares difusas e derrames pleurais. Na fase pós-primária, as cavitações são mais frequentes nos segmentos ápico-posteriores dos lobos superiores ou segmentos superiores dos lobos inferiores. Na fase ativa da doença, as cavitações apresentam paredes mais espessas. Após a cura, encontram-se tuberculomas (nódulos ou massas pulmonares) associados ou não a pequenos nódulos satélites e/ou gânglios mediastinais calcificados (39).

Em pacientes coinfectados com *M. tuberculosis* e HIV, com baixa contagem de células CD4, as alterações são atípicas, com formas não cavitárias, infiltrados nos lobos inferiores, linfadenopatias hilares e derrame pleural. Contudo, em torno de 10 a 20% dos coinfectados, a radiografia do tórax pode se apresentar normal (37, 39).

1.1.4.3 Diagnóstico Microbiológico

1.1.4.3.1 Baciloscopia

A baciloscopia consiste em realizar um esfregaço em lâmina do material biológico, com posterior coloração de Ziehl-Neelsen, Kinyoun modificada ou auramina-O e rodamina. A mais empregada para o diagnóstico de TB é a de Ziehl-Neelsen e a amostra mais encaminhada para a pesquisa de BAAR é o escarro (40).

Na técnica de Ziehl-Neelsen, a amostra é primeiramente corada com fucsina de Ziehl-Neelsen, depois descorada com álcool-ácido e, posteriormente, contracorada com azul de metileno. A parede celular das micobactérias, com elevado teor em lipídeos, confere resistência a descoloração por álcool-ácido, deixando os bacilos corados na cor rosa.

Para escarro, os critérios de leitura e interpretação, segundo o Manual de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias, são: (1) quando não são encontrados BAAR em 100 campos examinados, relata-se “negativo”; (2) quando são visualizados de um a nove BAAR em 100 campos analisados, relatar a quantidade encontrada em 100 campos; (3) quando são encontrados 10 a 99 BAAR em 100 campos, reporta-se “positivo (+)”; (4) quando são encontrados em média um a dez BAAR por campo nos primeiros 50 campos, relata-se “positivo (++)”; e (5) quando são encontrados em média mais de 10 BAAR por campo nos primeiros 20 campos, relata-se “positivo (+++)”. Para as demais amostras biológicas, reporta-se apenas “positivo” ao encontrar BAAR ou “negativo” na ausência de BAAR (41).

1.1.4.3.2 Cultura

O exame cultural permite o isolamento e crescimento dos BAAR de amostras clínicas em meio específico. É considerado o exame padrão-ouro, com alta sensibilidade e

especificidade para a detecção de TB pulmonar e extrapulmonar. De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2008), a cultura para BAAR é recomendada nas seguintes situações: suspeita clínica, devido a sintomas respiratórios, exame de radiologia sugestivo e baciloscopia repetidamente negativa (mais de três amostras); casos suspeitos com baixa quantidade de bacilos, de coletas difíceis ou suspeita de TB extrapulmonar; contato com pessoas infectadas por TB resistente a drogas; pacientes com antecedentes de tratamento prévio; pacientes imunodeprimidos, como os infectados por HIV, a fim de realizar o teste de sensibilidade a antimicrobianos; casos suspeitos de micobactérias não causadoras de TB, para identificação da espécie; todo paciente finalizando o 2º mês de tratamento; todos os pacientes com indicação de retratamento (41).

A primeira etapa da cultura é o pré-tratamento das amostras, na qual materiais como urina, líquor e outros líquidos são centrifugados e frações de tecidos são fragmentados ou macerados. A segunda etapa é a fluidificação-descontaminação, necessária apenas para amostras oriundas de sítios não estéreis, como escarro, urina, secreções, lavado brônquico, lavado gástrico e fragmento de tecido cutâneo. As amostras consideradas não contaminadas são líquor, líquidos pleural, sinovial, peritoneal e pericárdico, fragmentos de órgãos, sangue e medula óssea. Os agentes fluidificantes-descontaminantes comumente usados são hidróxido de sódio, N-acetil-L-cisteína (NALC) e ácido oxálico (41).

A terceira fase é a semeadura. O método cultural mais utilizado é a semeadura em meio sólido a base de ovo ou ágar. Os mais empregados são Lowenstein-Jensen (LJ) e Ogawa-Kudoh (OK) que são a base de ovo e contêm o corante verde malaquita que inibe a microbiota contaminante. Os meios a base de ágar são o Middlebrook 7H10 e Middlebrook 7H11. São transparentes e permitem a visualização precoce das colônias. Existe também, geralmente, em laboratórios maiores ou de referência, a cultura em meio líquido, mais recomendada para amostras com baixa quantidade de BK, pois são mais enriquecidos que os sólidos. Os meios

líquidos são desenvolvidos, a partir dos meios Middlebrook 7H9 e Middlebrook 7H9 modificado, podendo ser aplicados em sistemas automatizados ou manuais (41).

A quarta etapa é a incubação. A maioria das micobactérias causadoras de TB cresce a 35-37°C, em incubadora comum. Devido ao crescimento lento das micobactérias, os meios devem ficar incubados por até oito (8) semanas. Finalmente, a quinta etapa é a leitura dos tubos semeados, avaliando-se as colônias, suas características morfológicas, presença de pigmento, aspecto (lisa ou rugosa) e a contaminação do tubo. Os tubos devem ser examinados a cada semana. Na presença de colônias suspeitas, deve-se fazer a baciloscopia das colônias para confirmação. Na ausência de colônias, incubar o tubo novamente. A leitura em meios sólidos e semi-quantificada, seguindo os seguintes critérios: “Cultura positiva (quantidade de colônias)”, quando houver menos de 20 colônias; “Cultura positiva (+) ”, quando houver de 20 a 100 colônias; “Cultura positiva (++) ”, quando houver mais de 100 colônias separadas; “Cultura positiva (+++) ”, quando houver colônias confluentes, formando uma espécie de tapete; e “Cultura negativa”, quando não houver crescimento de colônias (41).

1.1.4.3.3 XPERT MTB/RIF

O teste Xpert® MTB/RIF é um teste de amplificação de ácidos nucléicos utilizado para detecção de *M. tuberculosis* e para a triagem de cepas resistentes a fármacos. O teste consiste na purificação, concentração e amplificação de ácidos nucléicos por PCR em tempo real e na identificação de sequências de ácidos nucléicos no genoma TB (do *M. tuberculosis*), especificamente do gene *rpoB*. A diferença deste para os demais testes de amplificação de ácidos nucléicos utilizados na detecção de TB é que a plataforma do dispositivo de teste, o GeneXpert, integra e automatiza os três processos (preparação de amostras, amplificação e

detecção), necessários para a PCR em tempo real baseada em testes moleculares. O teste Xpert® MTB/RIF é atualmente único, pois utiliza um cartucho contendo todos os elementos necessários para a reação, incluindo reagentes liofilizados, tampões líquidos e soluções de lavagem (14). O teste pode fornecer resultados num laboratório local, em menos de duas horas, sem necessitar de tratamento da amostra ou de recursos humanos especializados em biologia molecular.

O Xpert® MTB/RIF detecta simultaneamente *M. tuberculosis* e a resistência à rifampicina pela amplificação, por meio de PCR, de cinco sondas sobrepostas que são complementares à região determinante da resistência à rifampicina, composta por 81 pares de bases do gene *rpoB* de *M. tuberculosis*. Em seguida, esta região é examinada com o objetivo de identificar mutações associadas à resistência à rifampicina. O processo de amplificação por PCR, neste teste, é *heminested* e o alvo amplificado é detectado em tempo real por fluorescência¹⁴. Neste processo, dois conjuntos de *primers* são utilizados em duas reações sucessivas. Na primeira PCR, um par de *primers* é usado para gerar produtos de DNA, que podem conter produtos amplificados a partir de áreas não-alvo. Os produtos da primeira PCR são, então, usados como modelo em uma segunda PCR, usando um *primer* diferente, cujo sítio de ligação esteja localizado dentro do primeiro produto amplificado, conseqüentemente, aumentando a especificidade da reação (14).

Para a execução do teste, uma amostra de escarro é tratada com um reagente contendo NaOH e isopropanol, o que reduz substancialmente os riscos biológicos, uma vez que diminui a viabilidade da *M. tuberculosis* por, pelo menos, seis *logs* (10⁶ vezes o número de microorganismos viáveis). A amostra tratada é manualmente transferida para um cartucho de plástico de uso único, já pré-carregado com os elementos necessários para a reação, incluindo tampões e o reagente. O cartucho é inserido no instrumento e um processo automático conclui o processamento da amostra, a extração do DNA e a PCR *heminested* em tempo real. Como o

sistema integra e automatiza totalmente as etapas de extração da amostra, amplificação e detecção em um cartucho, não há necessidade de manipulação do fragmento e, desta forma, o risco de contaminação cruzada é substancialmente reduzido. Os resultados são gerados automaticamente na tela e relatados como *M. tuberculosis* negativo ou positivo (com estimativas semi-quantitativas da concentração de *M. tuberculosis* relatadas como baixa, média ou alta) e sensível ou resistente à rifampicina. Um resultado positivo não necessariamente indica a presença de organismos viáveis, tendo em vista que a PCR identifica material genético de microrganismos vivos ou mortos (42, 43).

2 JUSTIFICATIVA

Em todo o mundo, a TB continua a ser um importante problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com *M. tuberculosis*. O Brasil ocupa o 18º lugar entre os 22 países que representam coletivamente 80% dos casos de TB globalmente, com incidência relatada de 32,4 casos / 100,000 habitantes / ano em 2016.

Para o diagnóstico de tuberculose, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a baciloscopia de escarro. No entanto, esta não é uma técnica sensível, e apenas 57% dos novos casos de TB pulmonar relatados foram bacilíferos. A cultura de escarro para micobactérias tem maior rendimento diagnóstico em comparação com a baciloscopia. No entanto, a cultura é mais demorada em seus resultados - cerca de 2-8 semanas - por isso é menos útil para guiar o processo de tomada de decisão clínica.

O teste Xpert MTB/RIF foi introduzido para o diagnóstico de TB e resistência à rifampicina em 2010. Pode ser realizado diretamente a partir de uma amostra clínica de escarro e os resultados são liberados em menos de duas horas. O Xpert é cada vez mais utilizado em muitos países como o teste diagnóstico inicial para TB. Poucos estudos avaliaram o efeito do Xpert no diagnóstico de TB em condições programáticas no Brasil. Assim, esse trabalho se justifica por avaliar o impacto da introdução do Xpert MTB/RIF no diagnóstico de TB em uma cidade com alta incidência de TB no Brasil.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o impacto do teste Xpert MTB/RIF no diagnóstico da TB.

3.2 Específicos

1. Avaliar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do Xpert MTB/RIF no escarro, utilizando como padrão-ouro a cultura de micobactérias.
2. Comparar um grupo de pacientes diagnosticados com os métodos tradicionais (pré-intervenção) com um grupo de pacientes diagnosticados após a introdução do Xpert MTB/RIF na rotina assistencial (pós-intervenção).

4 REFERÊNCIAS

- (1) World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016 [Cited 2017 Feb 16]. Available from:
http://www.who.int/tb/publications/global_report/en.
- (2) Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Ref Type: Online Source. 2017; 8(48).
- (3) Ministério da Saúde. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Ref Type: Online Source. 2008.
- (4) Stop TB Partnership and World Health Organization. Global Plan to Stop TB 2006–2015. Geneva, World Health Organization, 2006 (WHO/HTM/STB/2006.35). Ref Type: Online Source. 2006.
- (5) Ferreira A, A QKTKFMAHAMS. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. Rev Bras Epidemiol 2005; 8:142-149.
- (6) Conde MB, Melo FA, Marques AM, Cardoso NC, Pinheiro VG, Dalcin PT et al. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. J Bras Pneumol 2009; 35(10):1018-1048.
- (7) World Health Organization. Improving the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary and extrapulmonary tuberculosis among adults and adolescents. Recommendations for HIV prevalent and resource-constrained settings. Ref Type: Online Source. 2007.
- (8) Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose 2011. Ref Type: Online Source. 2011.

- (9) Getahun H, Harrington M, O'Brien R, Nunn P. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes. *Lancet*. 2007; 369(9578): 2042-2049.
- (10) Macpherson P, Dimairo M, Bandason T, Zezai A, Munyati SS, Butterworth AE et al. Risk factors for mortality in smear-negative tuberculosis suspects: a cohort study in Harare, Zimbabwe. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011; 15(10): 1390-1396.
- (11) Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de LA, Daley CL et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet*. 1999; 353(9151): 444-449.
- (12) Hernandez-Garduno E, Cook V, Kunimoto D, Elwood RK, Black WA, FitzGerald JM. Transmission of tuberculosis from smear negative patients: a molecular epidemiology study. *Thorax*. 2004; 59(4): 286-290.
- (13) Tostmann A, Kik SV, Kalisvaart NA, Sebek MM, Verver S, Boeree MJ et al. Tuberculosis transmission by patients with smear-negative pulmonary tuberculosis in a large cohort in the Netherlands. *Clin Infect Dis*. 2008; 47(9):1135-1142.
- (14) Tueller C, Chhajed PN, Buitrago-Tellez C, Frei R, Frey M, Tamm M. Value of smear and PCR in bronchoalveolar lavage fluid in culture positive pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J*. 2005; 26(5): 767-772.
- (15) Chen NH, Liu YC, Tsao TC, Wu TL, Hsieh MJ, Chuang ML et al. Combined bronchoalveolar lavage and polymerase chain reaction in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in smear-negative patients. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002; 6(4): 350-355.
- (16) Wong CF, Yew WW, Chan CY, Au LY, Cheung SW, Cheng AF. Rapid diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis via fiberoptic bronchoscopy: utility of polymerase chain reaction in bronchial aspirates as an adjunct to transbronchial biopsies. *Respir Med*. 1998; 92(6): 815-819.

- (17) Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med*. 2010; 363(11): 1005-1015.
- (18) Van RA, Page-Shipp L, Scott L, Sanne I, Stevens W. Xpert((R)) MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope? *Expert Rev Mol Diagn*. 2010; 10(7): 937-946.
- (19) Moore DA, Roper MH. Diagnosis of smear-negative tuberculosis in people with HIV/AIDS. *Lancet*. 2007; 370(9592): 1033-1034.
- (20) Anvisa. XPERT® MTB/RIF NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR. *Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde* 2011.
- (21) Durovni B, Saraceni V, van den Hof S, Trajman A, Cordeiro-Santos M, Cavalcante S et al. Impact of replacing smear microscopy with Xpert MTB/RIF for diagnosing tuberculosis in Brazil: a stepped-wedge cluster-randomized trial. *PLoS Med*. 2014; 11(12): e1001766.
- (22) Van Kampen SC, Susanto NH, Simon S, Astiti SD, Chandra R, Burhan E et al. Effects of Introducing Xpert MTB/RIF on Diagnosis and Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis Patients in Indonesia: A Pre-Post Intervention Study. *PLoS One*. 2015; 10(6): e0123536.
- (23) Cunha TN. et al. Em busca de lipossomas inteligentes para a administração de drogas para a tuberculose. *Boletim Epidemiológico Paulista*. 2007 mar; 4(39).
- (24) Kulkarni P et al. Non-adherence of new pulmonary tuberculosis patients to antituberculosis treatment. *Annals of Medical and Health Sciences Research*. 2013; 3(1): 67-74. doi: 10.4103/2141-9248.109507.
- (25) Secretaria Estadual da Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde RS/CEVS. *Tuberculose no Rio Grande do Sul: Relatório Técnico Anual 2014-2015*.

- (26) Knechel NA. Tuberculosis: pathophysiology, clinical features, and diagnosis. *Crit Care Nurse*. 2009; (29): 34-43; quiz 44.
- (27) Kaufmann SH, McMichael, AJ. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nature medicine*. 2005; (11): S33-44.
- (28) Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol*. 5(1):39-47.
- (29) Comstock GW. Epidemiology of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1982; 125: 8–15.
Comas I, Gagneux, S. The past and future of tuberculosis research. *PLoS pathogens*. 2009; 5, e1000600.
- (30) Verver S, Warren RM, Beyers N, Richardson M, Van der Spuy GD, Borgdorff MW, Enarson DA, Behr MA, van Helden PD. Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171(12): 1430-5.
- (31) Miranda SM, Breiman A, Allain S, Deknuydt F, Altare F. The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clin Dev Immunol*. 2012; 139:127.
- (32) Borgdorff MW, Floyd K, Broekmans JF. Interventions to reduce tuberculosis mortality and transmission in low and middle –income countries. *Bull World Health Health Organ*. 2002; 80(3):217-27.
- (33) Conde MB, Fiusa de Melo A, Marques AM, Cardoso NC, Pinheiro VGF, Dalcin PTR. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on Tuberculosis. *J Bras Pneumol*. 2009; 35(10): 1018-48.
- (34) Storla DG, Yimer S, Bjune GA. A systematic review of delay in in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *BMC Public Health*. 2008; 8:15.

- (35) Façanha MC, Melo MA, Vasconcelos FF, Sousa JRP, Pinheiro AS, Porto IA, Parente JM. Treinamento da equipe de saúde e busca ativa na comunidade: estratégias para a detecção de casos de TB. *J Bras Pneumol*. 2009; 35(5):449-454.
- (36) Sharma SK, Mohan A. Tuberculosis: from an incurable scourge to a curable disease - journey over a millennium. *Indian Journal of Medical Research*, New Delhi. 2013; 137(3): 455-493.
- (37) Bento J et al. Metodos diagnosticos em tuberculose. *Acta Médica Portuguesa*. 2011; 24(1): 145-154.
- (38) Chang KC et al. Supervised and induced sputum among patients with smear-negative pulmonary tuberculosis. *European Respiratory Journal*. Redwood 2008; 31(10): 85-90.
- (39) Bombarda S et al. Imagem em tuberculose pulmonar. *Jornal de Pneumologia*, Brasília. 2001; 27(6).
- (40) Palomino JC. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *European Respiratory Journal*, Redwood. 2005; 26(2): 339-350.
- (41) Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. 2011. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/TB/mat_tec/manuais/MS11_Manual_Recom.pdf> . Acesso em: 20 de junho 2017.
- (42) Van Rie A, Page-Shipp L, Scott L, Sanne I, Stevens W. Xpert(®) MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope? *Expert Rev Mol Diagn*. 2010; 10(7):937-46.
- (43) Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND). Frequently Asked Questions on Xpert MTB/RIF assay. 2011. Disponível em:

<http://www.finddiagnostics.org/export/sites/default/media/press/pdf/Xpert_FAQs.pdf>.

Acesso em: 22 ago. 2011.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

5.1 **Title:** Impact of Introduction of Xpert Mtb/Rif Test on Tuberculosis (Tb) Diagnosis in a City With High tb Incidence in Brazil.

Authors: Giovana Rodrigues Pereira^{1,2}, Márcia Silva Barbosa³, Natan José Dutra Dias⁴, Carlos Podalirio Borges de Almeida¹, Denise Rossato Silva^{1,5}.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

²Setor de Tuberculose, Laboratório Municipal de Alvorada, Alvorada, Brasil

³Microbiologia, Faculdade Factum, Porto Alegre, Brasil

⁴Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

⁵Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Corresponding author:

Denise Rossato Silva.

Serviço de Pneumologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350, 2º andar

Porto Alegre, RS CEP 90.035-003

Phone: 55-51-33598241 Fax : 55-51-33598000

Email: denise.rossato@terra.com.br

ABSTRACT

Background: Xpert MTB/RIF is increasingly used in many countries as the initial diagnostic test for tuberculosis (TB). Few studies have evaluated the effect of Xpert on TB diagnosis under programmatic conditions in Brazil. The aim of the present study was to evaluate the impact of introduction of Xpert MTB/RIF on TB diagnosis in a city with high TB incidence in Brazil.

Methods: We included patients evaluated with conventional diagnostic tests during one year before Xpert introduction (pre-Xpert group) and patients evaluated using Xpert during one year after the test introduction (post-Xpert group). **Results:** 620 patients met the inclusion criteria (208 in the pre-Xpert group and 412 in the post-Xpert group) and were included in the analysis. The time until TB diagnosis was shorter in post-Xpert group (0.7 day, IQR: 0.5-1.0 day) than in pre-Xpert group (2.0 days, IQR: 2.0-2.0 days) ($p < 0.0001$). Atypical disease characteristics, such as less weight loss, fever, dyspnea, night sweats, and hemoptysis; a negative sputum smear; a negative culture, and a chest X-ray atypical of TB were more common in post-Xpert group than in pre-Xpert group ($p < 0.0001$ for all). **Conclusions:** We found that the implementation of the Xpert MTB/RIF assay, under programmatic conditions, improve and facilitate TB diagnosis, especially in cases with atypical disease manifestations. These results are likely to be generalizable to settings with a similar high TB incidence.

Keywords: tuberculosis; diagnosis; Xpert MTB/RIF; smear-negative pulmonary tuberculosis

INTRODUCTION

Across the world tuberculosis (TB) remains an important public health problem, especially in developing countries. It is estimated that one third of the world population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Brazil is in 18th place among the 22 countries that collectively account for 80% of TB cases globally, with reported incidence of 32.4 cases/100,000 inhabitants/year in 2016 (1;2).

For TB diagnosis, the World Health Organization (WHO) recommends initial smear microscopy for the detection of acid-fast bacilli (AFB). However, this is not a sensitive technique, and only 57% of new cases of pulmonary TB reported were smear-positive (2). Sputum culture for mycobacteria has higher diagnostic yield in comparison with smear microscopy. Nevertheless, culture is more time-consuming in its results – the turn-around time is about 2-8 weeks – so it is less useful to guide the clinical decision-making process (3).

Xpert MTB/RIF assay has been introduced for the diagnosis of TB and rifampicin resistance in 2010. The assay can be performed directly from a clinical sputum sample or from a decontaminated sputum pellet and can generally be completed in less than two hours. Xpert is increasingly used in many countries as the initial diagnostic test for TB (4;5). Few studies have evaluated the effect of Xpert on TB diagnosis under programmatic conditions in Brazil (6;7). Therefore, the aim of the present study was to evaluate the impact of introduction of Xpert MTB/RIF on TB diagnosis in a city with high TB incidence in Brazil.

METHODS

STUDY DESIGN AND LOCATION

We conducted a cross-sectional study in an outpatient TB clinic in Alvorada, RS, Brazil. Alvorada is a city in the metropolitan area of Porto Alegre, which is the fourth Brazilian capital with the highest number of TB cases, with an incidence of 80.4 cases/100,000 inhabitants (1). The study was approved by the Ethics Committee in January 15th, 2016 (number 16-0063).

The present study was designed to investigate the impact of Xpert introduction. We included patients evaluated with conventional diagnostic tests during one year before Xpert introduction (pre-Xpert group) and patients evaluated using Xpert during one year after the test introduction (post-Xpert group). We did not include patients evaluated during one month between these two periods, as it was a transition period.

PATIENTS

Outpatients aged > 18 years with respiratory symptoms suggestive of pulmonary TB, like productive cough for > 2 weeks, cough of any duration accompanied by constitutional symptoms (fever for at least 3 days, night sweats or weight loss of at least 3 kg in the previous month), or hemoptysis, who were able to collect a sputum sample were included in the study. Patients with extrapulmonary TB and those who were unable to collect a sputum sample were excluded from this study. Pulmonary TB was diagnosed according to the Brazilian Guidelines for Tuberculosis (3).

DATA COLLECTION

The following data were collected from patient records using a standardized data extraction tool: demographic data (sex, age, race), and medical history (symptoms, presence of comorbidities, diagnostic test, time until diagnosis, and treatment outcome [cure, dropout, death]). Chest X-rays (CXRs) were classified as typical of TB (the presence of nodular, alveolar, or interstitial infiltrates predominantly affecting the zones above the clavicles or upper zones; the presence of cavitation affecting the upper zones or the apical segment of the lower lobe), or compatible with TB (enlarged hilar nodes, pneumonic lesion, atelectasis, mass lesion, miliary), according to previously described guidelines (8).

Sputum smears were stained by Ziehl-Neelsen (ZN) staining technique for the detection of AFB, and culture was performed using the Ogawa-Kudoh method. For Xpert MTB/RIF, clinical sputum samples are treated with a sodium hydroxide and isopropanol-containing sample reagent (SR). The SR is added to the sample and incubated at room temperature for 15 min. This step is designed to reduce the viability of *M. tuberculosis* in sputum at least 10^6 -fold to reduce biohazard risk. The treated sample is then manually transferred to the cartridge that is preloaded with liquid buffers and lyophilized reagent beads necessary for sample processing, DNA extraction and heminested RT-PCR. Subsequent processing is fully automated. The results are generated automatically on the screen and reported as *M. tuberculosis* detected or not detected (with semi-quantitative estimates of *M. tuberculosis* concentration reported as low, medium or high) and susceptible or resistant to rifampicin.

STATISTICAL ANALYSIS

Data analysis was performed using SPSS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Illinois) and MedCalc 16.4.3 software package (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Data were presented as number of cases, mean \pm standard deviation (SD), or median with interquartile range (IQR). Categorical comparisons were performed by chi-square test using Yates's correction if indicated or by Fisher's exact test. Continuous variables were compared using the *t*-test or Wilcoxon test. A two-sided *p* value < 0.05 was considered significant for all analyses.

Positive mycobacterial culture results were defined as a gold standard of the diagnosis. On the basis of culture results, we calculated the sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value with 95% CIs of the Xpert MTB/RIF for the detection of TB. We constructed receiver operating characteristic (ROC) curves for Xpert MTB/RIF.

In order to calculate the sample size, it was considered that the sensitivity of Xpert MTB/RIF varies from 70% to 98% (4), depending on the smears results. Thus, with a confidence interval of 95% and a power of 80%, it will be necessary to include at least 246 patients to calculate sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value. For the comparison of the pre- and post-Xpert groups, considering an alpha error of 0.05 and a beta error of 0.20, 121 patients will be required per group (9).

RESULTS

During the study period, 620 patients met the inclusion criteria (208 in the pre-Xpert group and 412 in the post-Xpert group) and were included in the analysis. The characteristics of the study population are shown in Table 1.

Cough was more frequent in post-Xpert group (n=402, 97.6%) than in pre-Xpert group (n=192, 91.8%) (p=0.002). All other symptoms (weight loss, fever, dyspnea, night sweats, and hemoptysis) were more frequent in pre-Xpert group in comparison with post-Xpert group (p<0.0001 for all). The median duration of symptoms was higher in pre-Xpert group (60.0 days, IQR: 30.0-90.0 days) as compared with post-Xpert group (35.0 days, IQR: 30.0-60.0 days) (p<0.0001). The number of HIV positive patients was statistically higher in pre-Xpert group (n=46, 22.1%) than in post-Xpert group (n=47, 11.4%) (p=0.001). Regarding diagnostic tests, a positive sputum smear, a positive culture, and a chest X-ray typical of TB were more common in pre-Xpert group than in post-Xpert group (p<0.0001). In addition, the time until TB diagnosis was shorter in post-Xpert group (0.7 day, IQR: 0.5-1.0 day) than in pre-Xpert group (2.0 days, IQR: 2.0-2.0 days) (p<0.0001).

Xpert MTB/RIF test was positive in 111/412 patients (26.9%), and RIF resistance was detected in 4/111 (3.6%) patients. Considering culture as the gold standard, the sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of Xpert MTB/RIF were 100.0% (95% CI 95.4-100.0), 90.1% (95% CI 86.4-93.1), 70.3% (95% CI 63.1-76.6), and 100.0% (95% CI 96.1-100.0), respectively. The area under the ROC curve was 0.95 for the Xpert MTB/RIF test (95% CI 0.93 to 0.97; p<0.0001) (Figure 1).

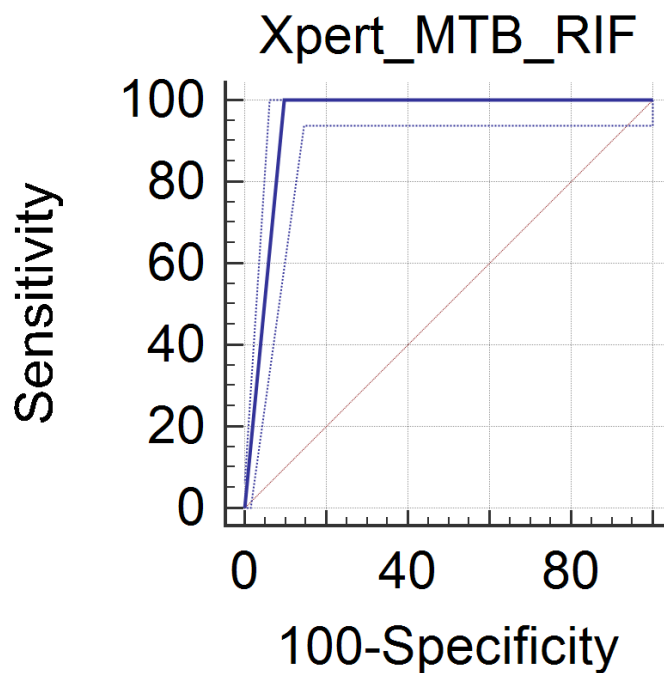
Table 1. Characteristics of study patients.

Characteristics	Pre-Xpert n=208	Post-Xpert n=412	p value
Demographic characteristics			
Age, yr	42.0 ± 15.9	51.5 ± 14.9	< 0.0001
Male sex	125 (60.1)	240 (58.3)	0.723
White race	148 (71.2)	318 (77.2)	0.123
Symptoms			
Cough	191 (91.8)	402 (97.6)	0.002
Weight loss	149 (71.6)	215 (52.2)	< 0.0001
Dyspnea	72 (34.6)	57 (13.8)	< 0.0001
Fever	110 (52.9)	72 (17.5)	< 0.0001
Night sweats	115 (55.3)	104 (25.2)	< 0.0001
Hemoptysis	28 (13.5)	12 (2.9)	< 0.0001
Duration of symptoms, days	60.0 (30.0-90.0)	35.0 (30.0-60.0)	< 0.0001
HIV positive	46 (22.1)	47 (11.4)	0.001
Radiographic patterns			
Typical of TB	172 (82.7)	97 (23.5)	< 0.0001
Compatible with TB	30 (14.4)	57 (13.8)	0.939
AFB smear positive	175 (84.1)	91 (22.1)	< 0.0001
Culture positive	173 (85.2)	78 (18.9)	< 0.0001
Xpert MTB/RIF positive	-	111 (26.9)	-
RIF resistance	-	4 (3.6)	-
Time until TB diagnosis, days	2.0 (2.0-2.0)	0.7 (0.5-1.0)	< 0.0001
Treatment outcomes			
Cure	145 (70.4)	116 (71.2)	0.962
Default	42 (20.4)	28 (17.2)	0.517
Death	12 (5.8)	7 (4.3)	0.672

*Data are presented as mean ± SD, n/N (%): number of cases with characteristic/total number of cases (percentage), or median (interquartile range). HIV: human immunodeficiency virus; TB: tuberculosis; AFB: acid-fast bacilli; MTB: Mycobacterium tuberculosis. RIF: rifampicin.

Figure 1. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve for the Detection of Tuberculosis with Xpert MTB/RIF test (The area under the ROC curve was 0.95 for the Xpert MTB/RIF test [95% CI 0.93 to 0.97; $p < 0.0001$]).

DISCUSSION



In the present study, we demonstrated that the characteristics of the patients evaluated after the introduction of Xpert test were statistically different from those evaluated pre-Xpert. They had more cough, and less frequently other symptoms, and the duration of those symptoms before diagnosis was lower. Also, a positive sputum smear, a positive culture, and a chest X-ray typical of TB were more common in pre-Xpert group than in post-Xpert group. In addition, the time until TB diagnosis was shorter in post-Xpert group than in pre-Xpert group.

The Xpert MTB/RIF test is a useful tool for early diagnosis of pulmonary TB. WHO's current policies and guidance recommend that Xpert MTB/RIF be used as an initial diagnostic

test in individuals suspected of having MDR-TB or HIV-associated TB (5). Several studies have identified Xpert MTB/RIF as a highly sensitive and specific test on both pulmonary and extrapulmonary TB (4;10-12). In our study, we demonstrated a sensitivity of 100% and a specificity of 90.1%. At least two previous studies also showed a sensitivity of 100% (13;14), and Rachow A. et al (15) found a similar specificity (90.9%).

In our study, XpertMTB/RIF established a diagnosis in a significant proportion of patients with smear-negative pulmonary TB (SNPT), and detected many TB cases missed by culture. *SNPT represents 30-60% of all TB cases, according to region (16). In Brazil, 24-30% of cases of pulmonary TB in adults are SNPT (17). The mortality of these patients can reach 25% in populations with high prevalence of HIV infection, which may be largely related to delay in diagnosis (18;19). We found that Xpert contributed to an earlier diagnosis, once patients were diagnosed with lower duration of symptoms in post-Xpert group than in pre-Xpert group. Additionally, the time until TB diagnosis was shorter in post-Xpert group as compared with pre-Xpert group.*

Although the frequency of cough was higher in post-Xpert group, other symptoms like weight loss, dyspnea, fever, night sweats, and hemoptysis were less frequent in the group evaluated after the introduction of Xpert. SNPT patients are especially likely to show no or mild respiratory symptoms and systemic manifestations (20). Studies have reported a decreased proportion of patients with dyspnea among SNPT patients (21;22). Hemoptysis is also less common in these patients (21).

Previous studies demonstrated that HIV positive patients are more likely to have SNPT than HIV negative ones (18;23-25). However, despite the high proportion of SNPT evaluated after Xpert introduction in the present study, the number of HIV positive patients was lower in post-Xpert group in comparison with pre-Xpert group. Some previous investigations (26;27) found no association between HIV infection and SNPT. In one of these studies (26), also

conducted in Brazil, including patients with clinical-radiological suspicion of SNPT, HIV infection was not among the variables significantly associated with a diagnosis of SNPT.

Chest X-rays typical of TB were less frequent in post-Xpert group than in pre-Xpert group. It is well known that atypical chest X-ray patterns or even normal findings were more frequent in SNPT (28;29). Typical radiological patterns of pulmonary TB reactivation, like upper lobe involvement or cavity formation are less often observed in SNPT patients (20). In this context, diagnosis of TB is therefore more challenging, and Xpert has an important role (30).

Cure rates were higher among post-Xpert group patients. Other treatment outcomes, like default and death rates were lower upon implementation of Xpert MTB/RIF; however, all these differences were not statistically significant. It was previously demonstrated that Xpert resulted in same day treatment initiation, but had no impact on tuberculosis treatment outcomes or mortality (31). Moreover, cure rate remains below the WHO's target of 85%, and default rates are still substantially high.

One of the limitations of this study is that we recruited patients from a single outpatient TB clinic. Furthermore, the present study did not allow us to identify differences related to costs between the periods before and after the introduction of Xpert MTB/RIF. In spite of these concerns, the knowledge of the impact of Xpert in important outcomes, such as time to treatment initiation, is relevant to TB control.

In conclusion, we found that the implementation of the Xpert MTB/RIF assay, under programmatic conditions, improve and facilitate TB diagnosis, especially in cases with atypical disease manifestations. These results are likely to be generalizable to settings with a similar high TB incidence.

REFERENCES

- (1) Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico 2017. Available at: www.saude.gov.br.
- (2) World Health Organization. WHO Report 2017. Available at: www.who.int.
- (3) Conde MB, Melo FA, Marques AM, Cardoso NC, Pinheiro VG, Dalcin PT et al. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. *J Bras Pneumol* 2009; 35(10):1018-1048.
- (4) Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010; 363(11):1005-1015.
- (5) World Health Organization. Tuberculosis diagnostics: Xpert MTB/RIF test rollout update 2017. Available at: www.who.int.
- (6) Durovni B, Saraceni V, van den Hof S, Trajman A, Cordeiro-Santos M, Cavalcante S et al. Impact of replacing smear microscopy with Xpert MTB/RIF for diagnosing tuberculosis in Brazil: a stepped-wedge cluster-randomized trial. *PLoS Med* 2014; 11(12):e1001766.
- (7) Pinto M, Steffen RE, Cobelens F, van den Hof S, Entringer A, Trajman A. Cost-effectiveness of the Xpert(R) MTB/RIF assay for tuberculosis diagnosis in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 2016; 20(5):611-618.
- (8) Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(4 Pt 1):1376-1395.
- (9) van Kampen SC, Susanto NH, Simon S, Astiti SD, Chandra R, Burhan E et al. Effects of Introducing Xpert MTB/RIF on Diagnosis and Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis Patients in Indonesia: A Pre-Post Intervention Study. *PLoS One* 2015; 10(6):e0123536.

- (10) Chang K, Lu W, Wang J, Zhang K, Jia S, Li F et al. Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis. *J Infect* 2012; 64(6):580-588.
- (11) Hillemann D, Rusch-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.
- (12) Malbruny B, Le MG, Courageux K, Leclercq R, Cattoir V. Rapid and efficient detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and non-respiratory samples. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15(4):553-555.
- (13) Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemaitre N. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49(5):1772-1776.
- (14) Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol* 2010; 48(1):229-237.
- (15) Rachow A, Zumla A, Heinrich N, Rojas-Ponce G, Mtafya B, Reither K et al. Rapid and accurate detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by Cepheid Xpert MTB/RIF assay--a clinical validation study. *PLoS One* 2011; 6(6):e20458.
- (16) World Health Organization. Improving the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary and extrapulmonary tuberculosis among adults and adolescents. Recommendations for HIV prevalent and resource-constrained settings. 2007. Available at: www.who.int.
- (17) Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose 2011. 2011. Available at: www.saude.gov.br.

- (18) Getahun H, Harrington M, O'Brien R, Nunn P. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes. *Lancet* 2007; 369(9578):2042-2049.
- (19) Macpherson P, Dimairo M, Bandason T, Zezai A, Munyati SS, Butterworth AE et al. Risk factors for mortality in smear-negative tuberculosis suspects: a cohort study in Harare, Zimbabwe. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15(10):1390-1396.
- (20) Tozkoparan E, Deniz O, Ciftci F, Bozkanat E, Bicak M, Mutlu H et al. The roles of HRCT and clinical parameters in assessing activity of suspected smear negative pulmonary tuberculosis. *Arch Med Res* 2005; 36(2):166-170.
- (21) Campos LC, Rocha MV, Willers DM, Silva DR. Characteristics of Patients with Smear-Negative Pulmonary Tuberculosis (TB) in a Region with High TB and HIV Prevalence. *PLoS One* 2016; 11(1):e0147933.
- (22) Palmieri F, Girardi E, Pellicelli AM, Rianda A, Bordi E, Rizzi EB et al. Pulmonary tuberculosis in HIV-infected patients presenting with normal chest radiograph and negative sputum smear. *Infection* 2002; 30(2):68-74.
- (23) Apers L, Wijarajah C, Mutsvangwa J, Chigara N, Mason P, van der Stuyft P. Accuracy of routine diagnosis of pulmonary tuberculosis in an area of high HIV prevalence. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8(8):945-951.
- (24) Elliott AM, Namaambo K, Allen BW, Luo N, Hayes RJ, Pobee JO et al. Negative sputum smear results in HIV-positive patients with pulmonary tuberculosis in Lusaka, Zambia. *Tuber Lung Dis* 1993; 74(3):191-194.
- (25) Harries AD, Nyirenda TE, Banerjee A, Boeree MJ, Salaniponi FM. Treatment outcome of patients with smear-negative and smear-positive pulmonary tuberculosis in the National Tuberculosis Control Programme, Malawi. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93(4):443-446.

- (26) Mello FC, Bastos LG, Soares SL, Rezende VM, Conde MB, Chaisson RE et al. Predicting smear negative pulmonary tuberculosis with classification trees and logistic regression: a cross-sectional study. *BMC Public Health* 2006; 6:43.
- (27) Soto A, Solari L, Diaz J, Mantilla A, Matthys F, van der Stuyft P. Validation of a clinical-radiographic score to assess the probability of pulmonary tuberculosis in suspect patients with negative sputum smears. *PLoS One* 2011; 6(4):e18486.
- (28) Kanaya AM, Glidden DV, Chambers HF. Identifying pulmonary tuberculosis in patients with negative sputum smear results. *Chest* 2001; 120(2):349-355.
- (29) Shah NS, Cavanaugh JS, Pratt R, Cain KP, Wells C, Laserson K et al. Epidemiology of smear-negative pulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2008. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16(9):1234-1240.
- (30) Colebunders R, Bastian I. A review of the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4(2):97-107.
- (31) Hanrahan CF, Selibas K, Deery CB, Dansey H, Clouse K, Bassett J et al. Time to treatment and patient outcomes among TB suspects screened by a single point-of-care xpert MTB/RIF at a primary care clinic in Johannesburg, South Africa. *PLoS One* 2013; 8(6):e65421.

6 CONCLUSÕES

No presente estudo, demonstramos que as características dos pacientes avaliados após a introdução do teste Xpert foram estatisticamente diferentes daqueles avaliados pré-Xpert. Eles tiveram mais tosse e menos frequentemente outros sintomas e a duração dos sintomas antes do diagnóstico foi menor. Além disso, uma baciloscopia positiva, uma cultura positiva e um raio X de tórax típico de TB foram mais comuns no grupo pré-Xpert do que no grupo pós-Xpert. Além disso, o tempo até o diagnóstico de TB foi menor no grupo pós-Xpert do que no grupo pré-Xpert.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A implantação do ensaio Xpert MTB / RIF, em condições programáticas, melhora e facilita o diagnóstico de tuberculose, especialmente em casos com manifestações de doença atípicas. Esses resultados são possivelmente generalizáveis para locais que tenham também uma alta incidência de TB.