



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL
(MACPro)

RONALDO BRUNO SANTOS MONTEIRO

**AVALIAR O USO DA TECNOLOGIA GENE XPERT MTB/ RIF[®] (CEPHEID,
SUNNYVALE, CA, USA) , NO DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE
PULMONAR EM UNIDADE DE SAÚDE DE BELÉM - PARÁ - BRASIL**

BELÉM-PA

2017

RONALDO BRUNO SANTOS MONTEIRO

**AVALIAR O USO DA TECNOLOGIA GENE XPERT MTB/ RIF[®] (CEPHEID,
SUNNYVALE, CA, USA) , NO DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE
PULMONAR EM UNIDADE DE SAÚDE DE BELÉM - PARÁ - BRASIL**

Artigo apresentado como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em
Análises Clínicas ao Programa de Pós-
Graduação em Análises Clínicas Profissional
da Universidade Federal do Pará.

Orientadora: Profa. Dra. Maísa Silva de Sousa

BELÉM-PA

2017

RONALDO BRUNO SANTOS MONTEIRO

**AVALIAR O USO DA TECNOLOGIA GENE XPERT MTB/ RIF[®] (CEPHEID,
SUNNYVALE, CA, USA) , NO DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE
PULMONAR EM UNIDADE DE SAÚDE DE BELÉM - PARÁ - BRASIL**

Artigo apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional (MACPro) da Universidade Federal do Pará (UFPA)

Aprovado em _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maísa Silva de Sousa (NMT/UFPA) – Presidente

Profa. Dra. Antônia Benedita Rodrigues Vieira - (ICB/UFPA) - Externo

Prof^a. Karla Valéria Batista Lima (SABAC/IEC) - Externo

Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado (ICB/UFPA) - Interno

BELÉM – PA

2017

LISTA DE ABREVIACÕES

BAAR	- bacilo álcool-ácido resistente
CMTB	- Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
GAL	- Gerenciamento de Ambiente Laboratorial
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
H	- isoniazida
MTB/RIF	- detecta <i>Mycobacterium tuberculosis</i> com resistência à rifampicina
MNT	- <i>Micobactérias Não Tuberculose</i>
NAAT	- testagem de amplificação de ácidos nucleicos
OMS/WHO	- Organização Mundial da Saúde
PCR	- reação em cadeia mediada pela polimerase
RT- PCR	- reação em cadeia mediada pela polimerase em tempo real
R/Rif	- rifampicina
SR	- sintomáticos respiratórios
SUS	- Sistema Único de Saúde
TRM	- teste rápido molecular
TB	- Tuberculose
TB-MR	- tuberculose multi resistente
TB-XDR	- tuberculose extensivamente resistente
UMS	- unidade municipal de saúde
ZN	- Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

ARTIGO	PG
TÍTULO	6
RESUMO / ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO.....	7
MÉTODOS	9
RESULTADOS	11
DISCUSSÃO.....	12
CONCLUSÃO	16
REFERÊNCIAS.....	16

Artigo

Avaliar o uso da tecnologia GeneXpert MTB/ RIF[®] (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), no diagnóstico de tuberculose pulmonar em unidade de saúde de belém - pará - brasil

RESUMO

Objetivo: Avaliar o uso do novo teste GeneXpert MTB/RIF[®] (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) em condições reais, no diagnóstico da tuberculose em uma população da região norte do Brasil. **Métodos:** No período de fevereiro a maio de 2016, em uma unidade de saúde de Belém do Pará, Brasil, foram analisadas amostras de pacientes sintomáticos respiratórios (SR), sem histórico de TB. As amostras foram processadas para pesquisa de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), cultura e o teste rápido molecular (TRM), usando a tecnologia conhecida como GeneXpert MTB/RIF[®]. **Resultados:** Foram investigados 120 pacientes, dos quais 52,50% (63/120) eram do sexo masculino ($p = 0,6481$), e 47,5% (57/120) do sexo feminino com 33,30% (21/63) de culturas positivas para o *M. tuberculosis*, não tendo sido observado crescimento de micobactérias não tuberculose (MNT). Do total de 40 culturas positivas, 32 (80,0%) também foram positivas pelo TRM ($S = 77,50\%$, $E = 98,75\%$, $VPP = 96,88\%$, $VPN = 89,77\%$ e $Acurácia = 91,67\%$) e 28 (70,00%) foram positivas pela baciloscopia ($S = 70,00\%$, $E = 100\%$, $VPP = 100\%$, $VPN = 86,96\%$ e $Acurácia = 90,00\%$). A concordância do TRM em relação à cultura foi de 91,70%. No período do estudo, foram identificados três casos de resistência às drogas do esquema básico no tratamento de TB, correspondendo a 7,5% dos 40 casos com cultura positiva. A co-infecção TB-HIV foi de 12%. **Conclusão:** O GeneXpert, não apresentou grande vantagem comparada com a baciloscopia, no entanto, se mostrou muito eficaz na detecção de resistência à rifampicina.

Descritores : Tuberculose, GeneXpert, TRM, Cultura, ZN e TB-HIV.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the use of the new GeneXpert MTB / RIF[®] test (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) under real conditions in the diagnosis of tuberculosis in a population from the northern region of Brazil. **Methods:** From February to May 2016, a sample of symptomatic respiratory patients (SR), with no history of TB, were analyzed in a health unit in Belém do Pará, Brazil. The samples were processed for acid-fast bacillus (AFB), culture and rapid molecular test (RMT), using the technology known as GeneXpert MTB / RIF[®]. **Results:** 120 patients were investigated, of which 52.50% (63/120) were males ($p = 0.6481$) and 47.5% (57/120) females with 33.30% (21 / 63) of cultures positive for *M. tuberculosis*, with no growth of non tuberculosis mycobacteria (NTM) observed. Of the total of 40 positive cultures, 32 (80.0%) were also positive by RMT ($S = 77.50\%$, $E = 98.75\%$, $PPV = 96.88\%$, $NPV = 89.77\%$ and $Accuracy = (S = 70.00\%$, $E = 100\%$, $PPV = 100\%$, $NPV = 86.96\%$ and $Accuracy = 90.00\%)$ were

positive by smear microscopy. The agreement of the MRT with respect to culture was 91.70%. In the study period, three cases of drug resistance were identified in the TB treatment scheme, corresponding to 7.5% of the 40 cases with positive culture. The TB-HIV co-infection was 12%. Conclusion: GeneXpert did not present a great advantage compared with smear microscopy, however, it was very effective in the detection of resistance to rifampicin.

Keywords: Tuberculosis, GeneXpert, MRT, Culture, ZN and TB-HIV.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença que apesar de antiga e bem conhecida ainda está longe de ser erradicada, nesse contexto, diagnosticar e tratar prontamente seriam, segundo o Ministério da Saúde (MS), as medidas mais eficazes para controlar e interromper a cadeia de transmissão da Tuberculose, pela descoberta precoce dos bacilíferos.^(8,15)

De acordo com dados oficiais, no ano de 2014, 9.6 milhões de pessoas adoeceram com tuberculose, dos quais 6 milhões eram casos novos da doença, o que sugere uma subnotificação ou falha no diagnóstico de aproximadamente 37% dos indivíduos. Do total de casos notificados neste ano, 12% eram novos casos de co-infecção com o HIV. Ainda, segundo a OMS, dos 480 mil casos estimados de TB multirresistente (TB-MR), apenas um quarto foi diagnosticado e notificado.^(1,2)

Outra meta do MS, na erradicação da TB, é o índice de casos novos de resistência, principalmente com os grupos vulneráveis, como a população privada de liberdade (PPL), os profissionais da saúde, as pessoas que vivem com HIV/Aids, a população em situação de rua, os povos indígenas, os contatos com multirresistentes, os usuários de drogas e pessoas em retratamento. Nesse último caso, como nos PPL, a incidência de casos novos chega a ser 40 vezes maior que a média nacional.^(6,9)

Em 2014, no Brasil, com o advento do Sistema de Informação de Tratamentos Especiais de Tuberculose (SITE-TB), houve um avanço, pois as resistências aos fármacos do tratamento da TB foram reclassificadas e notificadas no Brasil como 260 casos novos de monorresistência, 81 de polirresistência (dois ou mais fármacos, exceto rifampicina (R) e isoniazida (H), 374 de tuberculose multirresistente (TB-MDR), somente resistente a R e H, e 56 casos de tuberculose extensivamente resistentes (TB-XDR: R, H, uma fluoroquinolona e um medicamento injetável de 2ª Linha).⁽⁶⁾

O método padrão de diagnóstico usado nos laboratórios é a baciloscopia direta (ZN), que é de baixo custo, mas, com baixa sensibilidade, permitindo detectar apenas de 25-65% da tuberculose pulmonar, o que pode ser melhorado pela cultura, que é o padrão ouro, a qual permite acréscimo em até 20% no diagnóstico dos SR, mas que é demorada, levando o resultado de 30 até 62 dias para ser liberado.^(8,15)

Neste ambiente, de metas a serem cumpridas e de dificuldades enfrentadas surge a tecnologia do GeneXpert MTB/RIF[®] (Cepheid, Sunnyvale, Ca, USA) como uma ferramenta diferencial que aliaria a sensibilidade da cultura com a velocidade da baciloscopia sendo este, um teste de amplificação de ácidos nucleicos pela reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR), em tempo real, que detectaria rapidamente a presença do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) e identificaria as mutações mais associadas com a resistência à R , em uma PCR, heminested, automatizada mais simples e sem contaminação cruzada.⁽¹⁰⁾

Na implementação da tecnologia GeneXpert MTB/RIF[®] foi apresentado um custo estimado por pessoa para o GeneXpert de R\$ 35,57 e para a baciloscopia de R\$14,16, levando em consideração: os recursos humanos, insumos e reagentes, equipamentos e recursos administrativos, diferente dos R\$4,20 que é considerada pela tabela do SUS, para a baciloscopia.⁽³⁾

Além disso segundo o MS, o GeneXpert viria como a primeira prova diagnóstica para casos de suspeita de resistência e nas co-infecções de HIV que seriam paucibacilares.⁽⁹⁾

Na região Norte do Brasil, em 2014, o Pará, apresentou uma taxa de incidência de tuberculose de 39,2 / 100.000 habitantes, no entanto, na capital Belém, essa taxa de incidência aumenta muito para 83,2 / 100.000 habitantes, sendo a quinta maior do Brasil e foi selecionado, em 2015, para receber dois aparelhos moleculares destinados à cidade, para auxiliar no diagnóstico da tuberculose, aumentando a detecção de casos novos.^(6,7)

Em vista disso, este estudo objetivou determinar a acurácia do teste rápido molecular (TRM) pelo GeneXpert MTB-RIF, em SR de uma unidade municipal de saúde (UMS) em Belém do Pará, associado à sua implementação na rotina do Sistema Único de Saúde (SUS). Além disso, visou-se determinar a frequência de casos novos de TB identificados pelo teste rápido em SR; identificar a sensibilidade e a especificidade comparada à cultura; identificar a frequência da coexistência TB-HIV e, finalmente, determinar o índice de resistência à rifampicina (RIF) pelo TRM.

MÉTODOS

Das 183 amostras de escarro de SR, coletadas na Unidade Municipal de Saúde do Guamá (UMS Guamá), no período de fevereiro a maio de 2016, foram selecionadas 120 para o estudo. Foram excluídos deste estudo todos os pacientes com amostras inadequadas na qualidade (somente sangue, saliva ou com alimento) ou na quantidade (menos de 3 ml), assim como, os pacientes de retratamento e aqueles que não fizeram um dos três testes.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Ciências biológicas da Universidade Federal do Pará com CAAE: 63217315.3.0000.0018.

Solicitou-se apenas uma amostra por paciente, conforme orientado pelo MS (visto a suposta maior sensibilidade do GeneXpert comparada à baciloscopia), a qual foi submetida aos três processos: a baciloscopia pelo método Ziehl Neelsen (ZN), o TRM pelo GeneXpert MTB/RIF[®] e a cultura sólida ou líquida, conforme avaliação do Laboratório Central do Pará (LACEN), as quais foram realizadas em até cinco dias, ficando a amostra sob refrigeração (8 °C).

Todos os pacientes foram cadastrados no sistema de Gerenciamento de Ambiente Laboratorial (GAL), onde foram registrados seus dados pessoais, como: sexo, idade, endereço, data de nascimento, cartão do Sistema Único de Saúde (SUS), nome da mãe e armazenados num banco de dados estadual.

A sensibilidade, especificidade, acurácia e valores preditivos positivo e negativo do TRM e da baciloscopia frente à cultura foram avaliados pelo *Screening test* e a estatística Kappa (K) foi utilizada para verificar a concordância dos resultados do TRM e da baciloscopia com os resultados do padrão-ouro, ambos os testes executados pelo software BioEstat 5.4, considerando como significativos valores de $p \leq 0.05$.

A baciloscopia e o TRM foram realizados no mesmo dia do recebimento da amostra. A cultura, se negativa, foi liberada em 30 dias e, se positiva, em até 60 dias, com teste de sensibilidade, conforme critério do LACEN. Foram consideradas positivas, neste estudo, as amostras que tiveram cultura positiva.

As amostras dos pacientes com resultado do TRM positivo para resistência à rifampicina foram repetidas e, se confirmadas, encaminhadas também ao LACEN, para ser feita a cultura líquida automatizada pelo sistema BACTEC MGIT 960 e os testes de sensibilidade.

Os pacientes com resultado de TRM positivo para TB, foram orientados para fazer a testagem rápida para o HIV na UMS Guamá, sendo esta realizada pelos kits do MS (Bioeasy e Abon). Os casos reagentes, em dois testes consecutivos, foram encaminhados ao Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) e Centro de Atendimento em Doenças Infecciosas Adquiridas (Casa Dia) para receber orientação, fazer a carga viral e tratamento da infecção.

A baciloscopia foi feita pelo método de Ziehl Neelsen, sem centrifugação do escarro, e com microscopia óptica sem fluorescência, estabelecido pelo MS.⁽¹⁵⁾

O TRM foi feito seguindo o Manual do Utilizador do *GeneXpert MTB/RIF® Dx System*, através de um *software* que acompanha o aparelho. Como controles externos de qualidade para funcionamento do aparelho, foram observados qualidade e quantidade da amostra, temperatura do laboratório até 30°C e armazenamento do kit até 28°C. Como controles internos de qualidade, tem-se o cartucho do aparelho que possui no seu interior: um controle de processamento da amostra (SPC) e um controle de checagem das sondas (PC).

A amostra (escarro) foi preparada na proporção de 1:2 em tubos falcon de 15 ml (quantidade mínima de escarro 1ml) com um reagente descontaminante, à base de isopropanol e NaOH (tampão) reduzindo a viabilidade do bacilo até seis logs (10^6), e foi submetida a agitação no vórtex, incubada por 15 minutos e colocada 2ml nos cartuchos próprios e descartáveis. No cartucho ocorreu a captura dos bacilos em uma membrana filtro, que foi lavada; em seguida, estes foram quebrados por ultrassom que liberou o DNA e, por fim, foram, misturados com os reagentes de PCR, e realizada a amplificação usando cinco sondas que são complementares à região, as quais determinam resistência à rifampicina, composta de 81 pares de bases do gene *rpoB*.

No processo de heminested o alvo é amplificado e detectado em tempo real por fluorescência, demorando cerca de 1 hora e 45 minutos, somados os 15 minutos de preparação da amostra resultou em uma reação de 2 horas.^(11,12,13,14)

Nesta técnica, foram considerados 5 possíveis resultados: 1) MTB não detectado, 2,3) MTB detectado com resistência à rifampicina (detectada ou não detectada), 4) erro ou inválido e 5) Indeterminado.⁽⁴⁾

As amostras para cultura foram cadastradas no GAL e encaminhadas para o LACEN, independente do resultado do TRM, devidamente armazenadas e seguindo os critérios de biossegurança e onde foram cultivadas em meio sólido Ogawa Kudow (OGK) ou Lowestein-Jensen (LJ), de acordo com a disponibilidade do LACEN,

seguindo o controle de qualidade, preconizado pelo MS. Os testes de identificação (análise microscópica da colônia para verificar a formação de corda, inibição de crescimento em meio LJ-PNB e teste da Niacina) foram realizados nas amostras positivas para identificar o CMTB e diferenciar do Complexo das Micobactérias não Tuberculosas (MNT).⁽¹⁵⁾

Os testes de cultura líquida automatizada (BACTEC MGIT 960) e Testes de sensibilidade (TS), pelo método das concentrações absolutas, método da razão da resistência e o método das proporções, foram realizados dando prioridade para os suspeitos de resistência, esperando-se identificar o perfil de resistência dos bacilos das amostras. Todas as amostras foram processadas e passaram pelo controle de qualidade segundo o manual do Ministério da Saúde.⁽¹⁵⁾

RESULTADOS

De um total de 183 pacientes analisados, foram elegíveis 120 para o estudo, dos quais 47,50% (57/120) eram do sexo feminino e 52,50% (63/120) do sexo masculino ($p = 0,6481$), ambos com 33,30% (19/57 e 21/63, respectivamente) de culturas positivas para o *M. tuberculosis*, não tendo sido observado crescimento de MNT.

Do total de 40 culturas positivas, 32 (80,0%) também foram positivas pelo TRM ($S = 77,50\%$, $E = 98,75\%$, $VPP = 96,88\%$, $VPN = 89,77\%$ e $Acurácia = 91,67\%$) e 28 (70,00%) foram positivas pela baciloscopia ($S = 70,00\%$, $E = 100\%$, $VPP = 100\%$, $VPN = 86,96\%$ e $Acurácia = 90,00\%$). A concordância da TRM em relação à cultura foi de 91,70%, sendo classificada como “excelente” ($K = 0,8026$, $p < 0,0001$) e a baciloscopia foi 90% ($K = 0,7568$, $p < 0,0001$) concordante com o padrão-ouro, sendo esta também classificada como “excelente”.

Dentre as 8 amostras que deram negativo no TRM, as mesmas apresentaram baixa carga bacilar, variando de 5 a 20 UFC pela cultura.

Tabela 1: Comparação da baciloscopia e teste rápido molecular com a cultura. Temos na ordem VPP= valor preditivo positivo; VPN= valor preditivo negativo; ZN= Ziehl Neelsen e TRM= teste rápido molecular.

Pesquisas	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)	Concordância (%)	Acurácia (%)
ZN	70,0	100,0	100,0	89,96	90,0	90,0
TRM	77,5	98,5	96,88	89,71	91,7	91,67

As taxas de detecção de casos de TB pulmonar pela cultura, TRM e baciloscopia pela técnica de ZN foram 33,30% (40/120), 26,70% (32/120) e 23,30% (28/120),

respectivamente, não sendo significativas as diferenças entre estas proporções ($p = 0,2121$), considerando um resultado falso-positivo pelo TRM.

Dentre os resultados divergentes, o TRM foi negativo em uma amostra com cultura que apresentou crescimento de 5 a 20 bacilos.

Tabela2. Divergências nos resultados com 120 pacientes e 40 culturas positivas. Temos na ordem TRM= teste rápido molecular; ZN = Ziehl Neelsen.

n. pacientes	Cultura	TRM	ZN	Resultados
28	+	+	+	Todos Positivos de acordo
04	+	+	-	Falso ZN Negativo
08	+	-	-	Falso TRM Negativo
01	-	+	-	Falso TRM Positivo
79	-	-	-	Todos Negativos de Acordo

No período do estudo, foram identificados três casos de resistência, correspondendo a 9,4% dos 32 positivos pelo TRM e a 7,5% dos 40 casos com cultura positiva. Dois desses casos foram inicialmente identificados como resistentes à rifampicina (R) pelo GeneXpert, depois confirmados pela cultura e teste de sensibilidade, sendo um resistente à R, isoniazida (H), etambutol (E) e kanamicina (K) e o outro resistente à R, H, E, estreptomicina (S) e ofloxacino, ambos classificados como polirresistente. O terceiro caso apresentou perfil de Tuberculose com monorresistência à isoniazida, sendo este identificado somente pela cultura.

O teste rápido para o HIV foi oferecido para 40 sintomáticos respiratórios com cultura positiva, dos quais 25 (60,0%) o realizaram. Foram identificados 03 (três) casos positivos, representando 12% de coinfeção.

Tabela 3: Frequências dos resultados dos testes realizados.

Exames	Frequência dos Resultados
Gênero masculino testado	52,5% (63/120)
Gênero feminino testado	47,5% (57/120)
Culturas positivas	33,3% (40/120)
TRM positivos	26,7% (32/120)
Baciloscopias positivas	23,3% (28/120)
HIV positivos	12% (03/25)
Resistência	7,5% (03/40)

DISCUSSÃO

A proposta com esse trabalho foi avaliar a eficácia e implementação do TRM GeneXpert MTB/RIF® na rotina do SUS comparada com o padrão-ouro para o

diagnóstico da tuberculose que é a cultura, a qual, apesar de altamente sensível e específica, é demorada (até 62 dias). Comparou-se também com a baciloscopia, técnica convencional e amplamente usada, que apesar de ser barata e rápida tem baixa sensibilidade (25-65%). Deste modo buscou-se estudar o TRM dentro de um ambiente real, de uma região com uma alta taxa de incidência de tuberculose, em uma população considerada em sua maioria de baixa renda.⁽¹⁵⁾

Nesse contexto, o GeneXpert MTB/RIF, apesar de um custo mais elevado (R\$54,45), comparado com a baciloscopia (R\$ 4,20), veio como uma ferramenta que se acredita capaz de oferecer um diagnóstico mais rápido, sensível e preciso, no intuito de contribuir com a proposta da OMS, que é de diminuir a propagação da TB, ajudando na sua erradicação.^(16,2)

Neste trabalho teve-se como diferencial usar somente os recursos disponíveis pelo Sistema Único de Saúde (SUS), dentro da realidade de um atendimento com demanda espontânea, público, sem processos de enriquecimento da amostra (centrifugação refrigerada) ou tecnologia mais sensíveis (coloração com Auramina O e microscópio com fluorescência).

Foi usado na maior parte do tempo, a cultura em meios sólidos (OGK E LJ), ao invés da cultura líquida automatizada (BACTEC MGIT 960), sem recursos voltados para pesquisa, seguindo a rotina apenas para identificação do CMTB e verificação de resistência, ainda enfrentando os problemas de falta de insumos, muito comuns no sistema público.

Em vista dessas dificuldades e no intuito de otimizar o diagnóstico, foi implementado, pelo laboratório da UBS Guamá, uma requisição padronizada para o TRM, ZN e cultura afim de melhorar a qualidade das informações que chegam ao laboratório e abastecem o GAL. Além disso, foram feitas mudanças na coleta, para o GeneXpert, seguindo o protocolo do MS, onde ao invés de usar duas amostras padronizadas para o ZN, usou apenas uma coleta, porém, de boa qualidade.

Neste estudo com o GeneXpert, obteve-se uma sensibilidade (S) geral de 77,5%, o que de acordo com um artigo de revisão⁽⁹⁾, foi observado estar abaixo de outros achados como os 90,3% de Ioannidis, et al (2011), mas, em conformidade com os 79% de Armand, et al (2011). Entretanto, em amostras ZN negativas, este estudo apresentou sensibilidade de 30,8%, que é menor quando comparada a outros estudos, como o de Boheme, et al (2010), Marlowe, et al (2011) e Armand, et al (2011), com respectivos 67,1%, 72% e 57%.^(9,16,17,18,24,28)

A sensibilidade da baciloscopia se apresentou em 70,0%, o que está de acordo com outros estudos como o de Boheme et al, 2011, com 67,1%. A especificidade do TRM (98,5%) foi alta e esteve de acordo com outros estudos, como o de Boheme com 99%. Comparados com a cultura, o TRM apresentou neste estudo uma concordância considerada excelente (91,7%), da mesma forma com a baciloscopia (90,0%), demonstrando assim que tiveram uma acurácia similar.

Na razão das sensibilidades, TRM / baciloscopia, com respectivos, 77,5% e 70,0% obteve-se uma vantagem de apenas 9,7% para o TRM, o que foi abaixo de estudos como de Iram, et al (2015), em que o Gene Xpert obteve uma melhora de 2 a 3 vezes na detecção de MTB comparadas à baciloscopia, e de 10-15% nas amostras de escarro negativas. Da mesma forma, em um estudo em Rondônia com sensibilidade de 72% para PCR e 48% para a baciloscopia obtiveram uma vantagem de 33,33% .⁽³¹⁾

Em nosso estudo, como explicação, para essa pequena diferença entre as nossas técnicas (ZN e TRM), observamos que além da pequena amostragem (120 pacientes), que entre os pacientes positivos pela cultura (40) tivemos dois grupos: um com alta carga bacilar (32/40) e outro com uma baixa carga bacilar (8/40), paucibacilares, com uma carga de 5-20 bacilos, os quais deram negativo no TRM e no ZN.⁽³²⁾

Entre as discrepâncias encontradas tivemos um TRM falso positivo, o que em geral, está associado com possível contaminação, e ou devido à característica própria do TRM que não diferencia bacilos vivos, de mortos. Contudo, sugere-se, como visto em outros estudos, que em amostras paucibacilares, as dificuldades logísticas e de armazenamento, poderiam reduzir a viabilidade dos bacilos e não necessariamente serem falsos positivos.^(18,19)

O falso positivo, poderia também ser explicado em estudos como o de Long, et al (2009), onde foi observado que, o uso comum dos antibióticos, do tipo fluoroquinolonas, para o tratamento de doenças das vias respiratórias, poderia atrasar e mascarar os resultados da cultura ao matar os bacilos viáveis, mas que estes apareceriam no TRM e assim positivos seriam confundidos com falsos negativos, o que poderia explicar um estudo de Aterhortua, et al (2015), onde encontraram-se 5,6% de amostras positivas para o GeneXpert e negativos para cultura.

Esses estudos sugerem que a cultura talvez não seja um perfeito padrão ouro, mas, também poderia ser explicado pelo fato do TRM não diferenciar bacilos vivos de mortos, não sendo por isso indicado no diagnóstico de retratamentos.^(20,21,22,23)

Os oito (8) resultados de culturas positivas com TRM e ZN negativos (falsos negativos) poderiam ser explicados pela maior sensibilidade esperada da cultura que permite identificar amostras positivas com até 10 a 100 UFC/ml, pois, enquanto que o TRM precisa de 131 UFC/ml, o ZN precisa de pelo menos de 5.000 a 10.000 UFC/ml para positivar. Foi constatado que nas divergências de TRM negativo e cultura positivas, as culturas tiveram crescimento de 5 a 20 UFC, as quais estão fora do alcance do TRM e do ZN.^(15,24,25)

Afim de aumentar a sensibilidade de amostras paucibacilares, o escarro induzido poderia melhorar esses casos, como visto em um estudo de coinfeção HIV-TB onde de 104 portadores de HIV, somente 80% eram capazes de produzir escarro apesar de todos apresentarem febre e tosse persistentes.^(26,27)

Apesar da identificação das MNT ser feito a partir da cultura, o TRM seria útil na associação ZN (+) / TRM (-) onde teria-se uma forte suspeita de MNT, servindo como uma triagem para a cultura, o que tem grande relevância, pois, algumas espécies são resistentes ao esquema terapêutico padrão da TB (Huh, 2014). Nesse estudo não se identificou nenhuma MNT, o que ficou abaixo de outro estudo que encontrou 41 MNT entre 217 amostras e comprovou a especificidade do GeneXpert.⁽³⁴⁾

Das 40 amostras positivas, neste estudo, foram observados 03 (três) casos resistentes (7,5%). Desses 02 (dois) casos (5,0%) foram detectadas pelo GeneXpert e confirmados 100% pela cultura, como visto também em Mekkadas et al (2015), tanto o resultado como também a correlação R e INH, e confirmando o TRM como importante diagnóstico precoce de multiressistência, sendo um dos benefícios mais esperados para este teste.^(25,28)

As 03 (três) amostras resistentes foram classificadas pela cultura como duas amostras polirresistentes (5,0%), e uma (2,5%) como monorresistente para isoniazida
(29)

Os 7,5% de resistência primária (3/40), observados neste estudo, estão muito acima da média nacional de casos novos de 2013, que foi de 0,7% (503/73.692) e de 2,9% no mundo, demonstrando que esses valores são possivelmente subestimados, o que pode ser verificado em estudos, como o de Atehortuia et al (2015) nos quais foram encontrados 8,6% (3/35) na resistência primária, assim como, um estudo de Lopes et al (2012) feito no estado do Pará, que identificou 14% de MDR-TB, demonstrando que existe uma subnotificação da resistência e justificando a importância do Gene Xpert em contribuir para a detecção precoce da resistência à tuberculose.^(2,20,29,35)

Dos 40 casos de TB positivos, foram realizados 25 testes de HIV, devido a fatores como: indisposição do usuário em fazer o teste (6); indisponibilidade do kit(1) e; pela demora no resultado da cultura(8). Ainda assim, dos 25 testes realizados foram detectados 3 casos positivos para o HIV, representando uma frequência de 12% de coinfeção TB-HIV. Este resultado, apesar da pequena amostragem, está acima da média nacional encontrada em 2013 (10,1%) e é muito maior do que o achado em outros estudos como o de Arora, et al (2015) na Índia com frequência de 2,6% (19/733) de coinfeção TB-HIV. ⁽³¹⁾

Estudos tem demonstrado que, existem falhas na estratégia da OMS para os pacientes vulneráveis (Ex: HIV positivos), crianças e extra pulmonares. Estes continuam a ser um problema no diagnóstico da tuberculose por não fazerem parte dos algoritmos da OMS, nos quais o GeneXpert poderia ser melhor aproveitado, pois há estudos em que o GeneXpert melhora de 2 a 3 vezes na TB extrapulmonar e de 10 a 15% nos escarros negativos, o que está de acordo com este estudo no qual, obteve-se uma melhora de 12,5% no diagnóstico dos escarros negativos. ^(33,34)

CONCLUSÃO

Este estudo não apresentou vantagem significativa do TRM pelo GeneXpert MTB-RIF na sensibilidade do diagnóstico da TB, comparada com à baciloscopia e, não se mostrou tão eficaz na detecção de paucibacilares quanto a cultura. Porém, mostrou-se eficaz na detecção de resistência à rifampicina, sendo uma importante ferramenta na triagem e detecção precoce da multirresistência da TB.

REFERÊNCIAS

1. WHO. Global tuberculosis report. Geneva, 2014. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
2. WHO. The End TB Strategy. Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. Geneva. Disponível em: http://www.who.int/tb/post2015_TBstrategy.pdf?ua=1.

3. Relatório Técnico. Estudos econômicos da incorporação do teste molecular GeneXpert™ MTB/Rif para o diagnóstico de tuberculose pulmonar no Sistema Único de Saúde. 2013. http://www.fundacaoataulphodepaiva.com.br/2013/07/Relatorio-tecnico_25042013.pdf
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. vol. 46, n. 9, Brasília-DF, 2015b. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/27/2015-007>
5. BRASIL. Boletim epidemiológico. vol. 46, n.9 2015a. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/MinSaude/boletim-epidemiologico-da-tuberculose-no-brasil>.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da tuberculose nos estados partes e associados do Mercosul 2009 a 2013. Brasília-DF, 2015c.
7. BRASIL. IBGE, CENSO 2010. <http://censo2010.ibge.gov.br>
- 8 . BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília-DF, 2011a. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_tb_novo.pdf.
9. BRASIL. Boletim Brasileiro de Avaliação de Saúde Tuberculose – Gene Xpert MTB/RIF® no diagnóstico da tuberculose pulmonar. – Ano VI. n.16. 2011b. Disponível em: http://200.214.130.94/rebrats/publicacoes/Brats_16.pdf .
10. Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, HO K, Kop J, Owens M R , Rodgers R, Banada P, Safi H, Blakemore R, Lan N T N, Jones-Lo´pez E C , Levi M, Burday M, Ayakaka I, Mugerwa R D, McMillan B, Winn-Deen E, Christel L, Dailey P, Perkins M D , Persing D H, Alland D. Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis and Rifampin Resistance by Use of On-Demand, Near-Patient Technology. J Clin Microb. Jan. 2010, p. 229–237 Vol. 48, No. 1 0095-1137/10/\$12.00 doi:10.1128/JCM.01463-09 Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
11. 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 Oct;10(7):937-46. doi: 10.1586/erm.10.67.
12. FIND. Foundation for Innovative New Diagnostics,.Frequently Asked Questions on Xpert MTB/RIF. 2011. Disponível em: http://www.who.int/tb/laboratory/xpert_faqs.pdf .
13. Bunsow E, Ruiz-Serrano MJ, López Roa P, Kestler M, Viedma DG, Bouza E. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for the detection of Mycobacterium tuberculosis

and resistance to rifampin in clinical specimens. *J Infect.* 2014 Apr;68(4):338-43. doi: 10.1016/j.jinf.2013.11.012. Epub 2013 Dec 1.

14. RELATÓRIO. Proposta de incorporação do Xpert MTB/RIF como teste diagnóstico de tuberculose e para indicação de resistência à rifampicina. Disponível em: <http://www.fundacaoataulphodepaiva.com.br/wp-content/uploads/2013/03/Relatorio-XpertMTBRIF-CP5.pdf>.

15. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb_3_9_10.pdf.

16. Marlowe E,M, Novak-Weekley S M, Cumpio J, Sharp S, E , Momeny M, Babst A, Carlson J A S, Kawamura M and Pandori M.Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF Assay for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Respiratory Specimens. *journal of Clinical Microbiology*, apr. 2011, p. 1621–1623 vol. 49, no. 4 0095-1137/11/\$12.00 doi:10.1128/jcm.02214-10.

17. Ioannidis P, Papaventsis D, Karabela S, Nikolaou S, Panagi M, Raftopoulou E, Konstantinidou E, Marinou I, Kanavaki S. Cepheid GeneXpert MTB/RIF assay for Mycobacterium tuberculosis detection and rifampin resistance identification in patients with substantial clinical indications of tuberculosis and smear-negative microscopy results. *Clin Microbiol.* 2011 Aug;49(8):3068-70. doi: 10.1128/JCM.00718-11. Epub 2011 Jun 15.

18. Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemaître 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 May;49(5):1772-6. doi: 10.1128/JCM.02157-10. Epub 2011 Mar 16.

19. Carniel F, Dalla Costa E R, Lima-Bello G, Martins C, Scherer L C, and Rossetti M L. Use of conventional PCR and smear microscopy to diagnose pulmonary tuberculosis in the Amazonian rainforest area. *Braz J Med Biol Res.* 2014 Dec; 47(12): 1016–1020. Published online 2014 Sep 16.doi: 10.1590/1414-431X20143899.

20. Atehortúa S, Ramírez R , Echeverri L M ,Peñata A , Ospina S. Xpert MTB/RIF test performance assay in respiratory samples at real work settings in a developing country. *Biomédica* vol.35 no.1 Bogotá Jan./Mar. 2015.<http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2330>

21. Long R, Chong H, Hoepfner V, Shanmuganathan H, KowalewskaGrochowska K, Shandro C, et al. Empirical treatment of community-acquired pneumonia and the development of fluoroquinolone-resistant tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2009;48:1354-60.

22. Pai M, Schito M . Tuberculosis diagnostics in 2015: landscape, priorities, needs, and prospects. *J Infect Dis.* 2015 Apr 1;211 Suppl 2:S21-8. doi: 10.1093/infdis/jiu803.
23. Pinyopornpanish K, Chaiwarith R, Pantip C, Keawvichit C, Wongworapat K, Khamnoi P, Supparatpinyo K, and Sirisanthana T. Comparison of Xpert MTB/RIF Assay and the Conventional Sputum Microscopy in Detecting Mycobacterium tuberculosis in Northern Thailand. *Tuberculosis Research and Treatment.* Volume 2015 (2015), Article ID 571782, 6 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/571782>
24. Cox H S, Mbhele S, Mohess N, Whitelaw A, Muller O, Zemanay W, Little F, Azevedo V, Simpson J, Boehme CC, Nicol MP. Impact of Xpert MTB/RIF for TB diagnosis in a primary care clinic with high TB and HIV prevalence in South Africa: a pragmatic randomised trial. *PLoS Med.* 2014 Nov 25;11(11):e1001760. doi: 10.1371/journal.pmed.1001760. eCollection 2014.
25. Feasey NA, Banada PP, Howson W, Sloan DJ, Mdolo A, Boehme C, Chipungu GA, Allain TJ, Heyderman RS, Corbett EL, Alland D. Evaluation of Xpert MTB/RIF for Detection of Tuberculosis from Blood Samples of HIV-Infected Adults Confirms Mycobacterium tuberculosis Bacteremia as an Indicator of Poor Prognosis. *J Clin Microbiol.* 2013 Jul;51(7):2311-6. doi: 10.1128/JCM.00330-13. Epub 2013 May 15.
26. Park KS, Kim J, Lee JW, Hwang Y, Jeon K, Koh W et al. Comparison of the Xpert MTB/RIF and Cobas TaqMan MTB Assays for Detection of Mycobacterium tuberculosis in Respiratory Specimens. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(10):3225-3227.
27. Boehme C C, 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;363:1005-15. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0907847>
28. Mokaddas E, Ahmad S, Eldeen HS, Al-Mutairi N. Discordance between Xpert MTB/RIF assay and Bactec MGIT 960 Culture System for detection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in a country with a low tuberculosis (TB) incidence. *J Clin Microbiol.* 2015 Apr;53(4):1351-4. doi: 10.1128/JCM.03412-14. Epub 2015 Jan 21.
29. WHO. Global tuberculosis report. Geneva, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/tb/> . Acess em: 29 jun. 2015.
30. Arora D, Jindal N, Bansal R, Arora S. Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis in Sputum Samples by Cepheid Xpert Assay: A Clinical Study. *J Clin Diagn Res.* 2015 May;9(5):DC03-5. doi: 10.7860/JCDR/2015/11352.5935. Epub 2015 May 1.

31. Pinhata, J M W. Detecção do Complexo Mycobacterium tuberculosis em escarro por PCR em tempo real / Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in sputum by real-time PCR. bvs. São Paulo; s.n; 2014. [114].Tese Português | SES SP - Programa de Pós-Graduação em Ciências | ID: ses-28120. <http://pesquisa.bvsalud.org/ses/resource/pt/ses-28120>

32. Huf G, Kritski A. Avaliação da utilidade clínica de novos testes diagnósticos em tuberculose: o papel dos ensaios clínicos pragmáticos. J. bras. pneumol. vol.38 no.2 São Paulo Mar./Apr. 2012 <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132012000200014>

33. Iram S, Zeenat A, Hussain S, Yusuf N W , and Aslam M. Rapid diagnosis of tuberculosis using Xpert MTB/RIF assay - Report from a developing country. Pak J Med Sci. 2015 Jan-Feb; 31(1): 105–110. doi: 10.12669/pjms.311.6970

34. Huh H,,J, Jeong, H, Jeon,K, Koh W-J, Ki,C-S and Lee N, Y. Performance evaluation of The Xpert MTB/RIF assay according to its clinical application.*BMC Infectious Diseases*14 November 2014:589.doi: 10.1186/s12879-014-0589-x

35. Lopes, Maria Luiza, et al. Annual frequency and distribution of tuberculosis resistance in the public health laboratory network of Pará State, Brazil. *Rev Pan-Amaz Saude* [online]. 2012, vol.3, n.4, pp.27-33. ISSN 2176-6223.