



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Avaliação da implementação do Teste Rápido Molecular para a
Tuberculose GeneXpertMTB/RIF no Programa de Controle da
Tuberculose da Prefeitura Municipal de Florianópolis/SC.**

MARIA EDUARDA VIEIRA CERNY

FLORIANÓPOLIS, SC

2016

MARIA EDUARDA VIEIRA CERNY

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Avaliação da implementação do Teste Rápido Molecular para a Tuberculose GeneXpertMTB/RIF no Programa de Controle da Tuberculose da Prefeitura Municipal de Florianópolis/SC.

Trabalho apresentado para o cumprimento da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (BIO 7016), como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof^aDr^a Maria Luiza Bazzo

FLORIANÓPOLIS, SC

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Natércia e Luís Henrique, por sempre procurar me dar tudo aquilo que eu precisei para minha formação, seja ela acadêmica, profissional ou pessoal. Pelo amor, incentivo e apoio incondicional, não alcançaria nenhum sonho sem vocês.

À minha irmã Marina, por me ajudar nos momentos de maior desespero, por corrigir e ter paciência ao me ensinar, por estar ao meu lado em todos os momentos importante da minha vida.

À minha professora Dr^a Maria Luiza Bazzo, pela oportunidade de estagiar em seu laboratório e por suas orientações.

Ao Laboratório de Saúde Pública - LAMUF, pela ajuda na pesquisa, disponibilidade de resultados e parceria, além dos ensinamentos práticos.

Aos mestrandos e doutorandos do LBMM, especialmente, Letícia, Thaís, Taiane, Renata, Alisson, Felipe, Marcos, Eduardo, Hana e Lisléia, por me ensinarem tudo o que sei hoje dentro do laboratório e por tornarem o local de trabalho uma “família”.

Ao meu namorado Tiago, pelo amor, carinho, paciência e por me acompanhar e durante essa caminhada.

As minhas amigas Barbára, Laís, Júlia, Ana Paula e Gabriele pelo incentivo e por estarem ao meu lado me animando sempre que necessário.

Por fim, agradeço a todos que me acompanharam nessa jornada.

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma das mais importantes doenças infecciosas. Por sua alta prevalência, estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, resultando em cerca de 1,5 milhão de mortes anualmente. Há fatores determinantes para o controle da doença, como a detecção rápida e terapia com esquemas terapêuticos bem definidos. Os métodos diagnósticos utilizados atualmente possuem limitações devido ao tempo de execução, uma vez que o resultado pode levar até 60 dias para ser liberado, nos casos de cultura sólida. A detecção do bacilo é fundamental para interromper o ciclo de transmissão da TB e consequentemente reduzir a incidência de Tuberculose população. Considerando-se a importância do diagnóstico, este trabalho teve como objetivo observar o desempenho do teste rápido molecular (TRM) Xpert® MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose e avaliar os dados da utilização do TRM no programa municipal de controle da tuberculose no Laboratório de Saúde Pública do Município de Florianópolis/SC (LAMUF). Métodos: Amostras de escarro foram obtidas junto ao Laboratório Municipal de Florianópolis, no período de janeiro a dezembro de 2015. Para aquelas indicadas para primeiro diagnóstico de TB, foi utilizado o teste GeneXpert MTB/RIF e realizada cultura para micobactérias em meio sólido. Resultados: Foram recebidas 1.212 amostras de escarro para primeiro diagnóstico, sendo quarenta e seis (3,8%) positivas em ambos os métodos e três (6,5%)(3/46) resistentes à rifampicina. Houve predomínio do gênero masculino (61,29%) e a média de idade dos pacientes foi de 39,08 ±14,4 anos. O teste Xpert MTB/RIF, utilizado para detecção de *Mycobacterium tuberculosis*, diretamente de amostras de escarro apresentou sensibilidade de 93,88%, especificidade 96,36% e Kappa de 0,798 que indica concordância boa entre as metodologias. Observou-se ainda a redução do tempo médio para liberação do resultado, a cultura sólida em meio Ogawa-Kudoh levou 20 dias (7 – 28) e o Xpert MTB/RIF levou duas horas. Conclusão: o presente estudo permitiu a avaliação da agilidade do diagnóstico molecular rápido da tuberculose no município de Florianópolis que apresentou dados satisfatórios uma vez que foi capaz de realizar o diagnóstico e detecção de resistência à rifampicina em aproximadamente duas horas e demonstrou alta sensibilidade e especificidade.

Palavras-chave: Tuberculose, diagnóstico, GeneXpert MTB/RIF.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Coeficiente de mortalidade por tuberculose. Brasil 2004 –2013.
- Figura 2 Coeficiente de incidência de tuberculose. Brasil 2005 –2014.
- Figura 3 Teste molecular rápido de tuberculose realizado para os possíveis casos novos, Rede de Teste Rápido para Tuberculose, Brasil, julho a dezembro de 2014.
- Figura 4 Fluxograma dos procedimentos realizados com amostras de escarro, recebidas pelo LAMUF.
- Figura 5 Preparo da amostra do teste GeneXpert MTB/RIF.
- Figura 6 Molecular beacons utilizadas para detecção de sequências amplificadas de DNA num ensaio de PCR em tempo real.
- Figura 7 Gênero dos pacientes que coletaram amostras de escarro para diagnóstico de TB enviadas ao LAMUF.
- Figura 8 Amostras positivas no teste Xpert MTB/RIF e cultura.
- Figura 9 Distribuição por faixa etária dos 49 pacientes cujas amostras foram reagentes na cultura para TB.
- Figura 10 Total de dias em que as culturas positivaram.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BK	Bacilo de Koch
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Etambutol
H	Isoniazida
LACEN/SC	Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina
LAMUF	Laboratório Municipal de Florianópolis
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
RTR-TB	Rede de Teste Rápido para Tuberculose
R	Rifampicina
ROC	do inglês <i>Receiver Operating Characteristic</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TB	Tuberculose
TRM	Teste Rápido Molecular
TB-MDR	Tuberculose Resistente a Múltiplos Fármacos
TSA	Teste de sensibilidade
Z	Pirazinamida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. TEMA E PROBLEMA DE PESQUISA.....	8
1.2. OBJETIVOS	14
1.2.1. OBJETIVO GERAL.....	14
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
1.3. METODOLOGIA	14
1.3.1. FLUXO DE AMOSTRAS.....	14
1.3.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	15
1.3.3. BACILOSCOPIA	16
1.3.4. CULTURA	16
2. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
3. RESULTADOS.....	20
4. DISCUSSÃO	23
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
REFERÊNCIAS.....	29

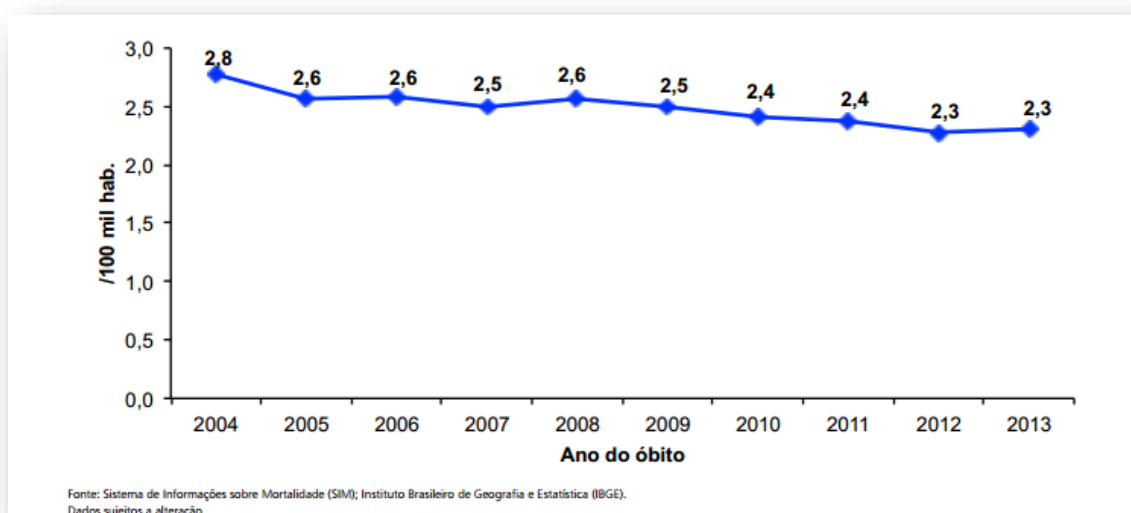
1. INTRODUÇÃO

1.1. TEMA E PROBLEMA DE PESQUISA

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), o qual tem como principal representante o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ou bacilo de Koch (BK). Atinge principalmente os pulmões (tuberculose pulmonar), mas pode ocorrer em outros sítios anatômicos (tuberculose extrapulmonar) ou de maneira disseminada (tuberculose miliar) (PANDOLFI et al., 2007).

A TB é uma das doenças infecciosas que mais causa mortes no mundo. Estima-se que dois bilhões de pessoas estejam infectadas pelo bacilo causador da doença. Em 2015, estima-se que tenham ocorrido 10,4 milhões de novos casos de TB no mundo, destes, 5,9 milhões (56%) em pacientes do gênero masculino, 3,5 milhões (34%) do gênero feminino e 1 milhão (10%) em crianças. Estima-se também que tenham ocorrido 1,4 milhões de mortes devido à doença naquele mesmo ano (WHO, 2014a; WHO, 2015; WHO, 2016). Somente no Brasil, foram diagnosticados de 2005 a 2014, 73 mil casos de TB por ano, em média, sendo que o coeficiente de mortalidade por tuberculose apresentou redução no período de 2004 a 2013 (Figura 1) (BRASIL, 2014; BRASIL, 2015).

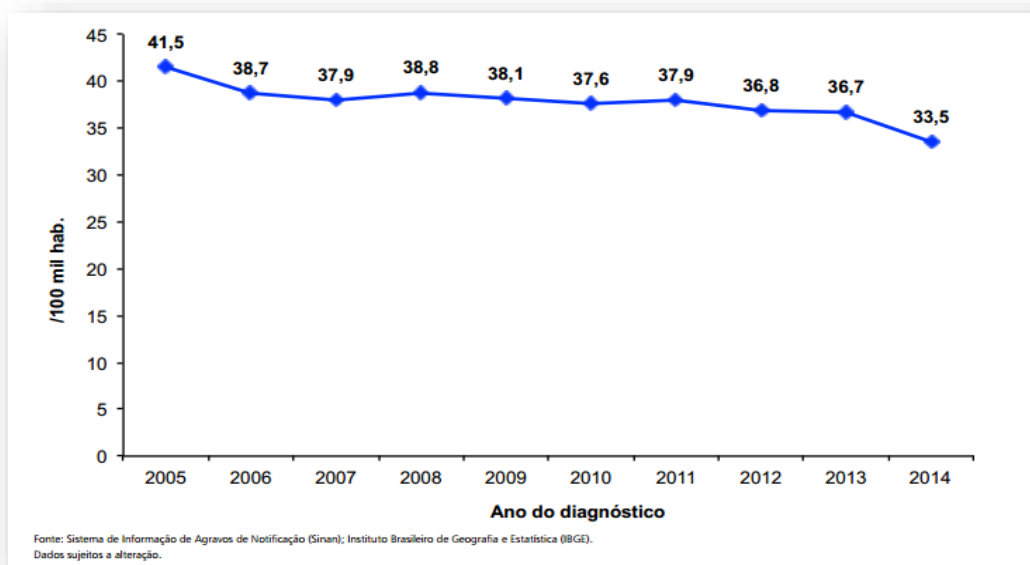
Figura 1. Coeficiente de mortalidade por tuberculose. Brasil 2004 –2013.



Fonte: BRASIL, 2015

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, o coeficiente de incidência da TB no Brasil vem reduzindo ao longo dos anos. Isso pode ser observado comparando-se os dados dos anos de 2005, com 41,5 casos /100 mil habitantes, com os dados de 2014, de 33,5 casos/100 mil habitantes, uma redução correspondente a 2,3% ao ano (Figura 2). Mesmo com a diminuição do coeficiente, ainda há desafios para a redução do número de casos da doença, sendo que o Brasil registra um número elevado de novos casos anualmente. Entre os estados brasileiros, Santa Catarina aparece entre aqueles com as taxas de incidência de TB mais baixas, 23,1/100.000 habitantes, porém há exceções: alguns municípios do estado possuem taxas iguais ou superiores à média nacional, como a capital de Santa Catarina, Florianópolis, que apresenta uma taxa de 41,1/100.000 habitantes (BRASIL, 2015; DIVE, 2016).

Figura 2. Coeficiente de incidência de tuberculose. Brasil 2005 –2014.



Fonte: BRASIL, 2015

A transmissão da TB ocorre de forma direta, por via aérea, através da inalação de partículas contendo o bacilo expelido por indivíduos com doença pulmonar ativa. A transmissão ocorre principalmente ao tossir, espirrar ou falar. Os pacientes com TB pulmonar podem apresentar sintomas, que são ignorados durante algum tempo, e outros podem não demonstrar nenhum indicativo da doença. Os sintomas mais frequentes são tosse seca, seguida por secreção (mais de três semanas) astenia, febre baixa, sudorese

noturna, emagrecimento, hemoptise e prostração (TORTOLI, 2009; STEINGART et al., 2014).

A TB é uma doença curável e seu tratamento envolve múltiplos fármacos durante um período de seis meses. Nos dois primeiros meses, o paciente deve fazer o uso de quatro fármacos simultaneamente - rifampicina (R), isoniazida (H), pirazinamida (Z) e etambutol (E) – e nos quatro meses seguintes, rifampicina e isoniazida (BRASIL, 2010). O sucesso do tratamento é alcançado com associação medicamentosa adequada, doses corretas e em tempo suficiente, porém por ser um processo longo, há ocorrência de abandono o que aumenta a chance de resistência da bactéria aos fármacos (BRASIL, 2010; PANDOLFI et al., 2007; STEINGART et al. 2014).

O diagnóstico inicial da TB é baseado em dados clínicos, porém, o diagnóstico definitivo depende do isolamento e da identificação laboratorial do MTB. A baciloscopia é um dos métodos diagnósticos mais utilizados mundialmente, devido a sua rapidez e baixo custo. Esta metodologia permite estimar a quantidade de bacilos presente na amostra, o que a torna também um método importante para monitorar a eficácia do tratamento, pela observação da redução da carga bacilar ou negatização na amostra clínica. Baseia-se na pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em uma amostra clínica, em queo esfregaço na lâmina é corado pelo método de Ziehl-Neelsen. A parede celular de MTB é composta por uma alta concentração de lipídios, entre eles os ácidos micólicos, que possuem grande capacidade de fixar o corante fucsina (corante vermelho), causando a característica de resistência à descoloração por soluções álcool-ácidas. Devido à característica hidrofóbica da parede celular, a penetração da fucsina é beneficiada pelo calor. O BAAR retém a fucsina após o procedimento de descoloração, enquanto as outras estruturas na lâmina são descoradas e coram-se pelo segundo corante usado, o azul de metileno (BRASIL, 2008a; GRIFFITH et al., 2007).

A principal desvantagem da baciloscopia é a sensibilidade limitada (40 a 80%), pois para se obter um resultado positivo há necessidade de que amostra contenha pelo menos 5.000 bacilos/mL. A negatividade desse método pode ocorrer em função do estágio inicial da doença e do estado imunológico do paciente, uma vez que indivíduos imunossuprimidos são paucibacilares (FERREIRA et al., 2005; PARSONS et al., 2011).

O método padrão-ouro para diagnosticar a TB é a cultura. Sua sensibilidade é verificada a partir de 100 bacilos/mL. Como o tempo de crescimento bacilar varia de duas a seis semanas, a cultura apresenta como desvantagem o tempo necessário para a liberação do resultado, principalmente com o uso dos meios sólidos. O diagnóstico tardio favorece a transmissão e conseqüentemente o aumento no número de casos da doença (FERREIRA et al., 2005; PARSONS et al., 2011).

A necessidade de um teste rápido e sensível para o diagnóstico laboratorial das micobactérias levou ao desenvolvimento dos métodos moleculares para detecção de MTB diretamente de amostras clínicas. Dentre as técnicas utilizadas para o diagnóstico, encontram-se aquelas que promovem a amplificação de ácidos nucléicos, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês, Polymerase Chain Reaction) e suas variações (Nested-PCR, Multiplex-PCR e PCR em tempo real, por exemplo) (BOHEME 2010). A sensibilidade desses testes é altamente dependente da eficiência do preparo da amostra, da extração do DNA e da presença de inibidores. Devido a esses fatores, ainda é necessário o desenvolvimento um método simples, rápido e efetivo para o diagnóstico da TB (BOHEME, et al., 2011).

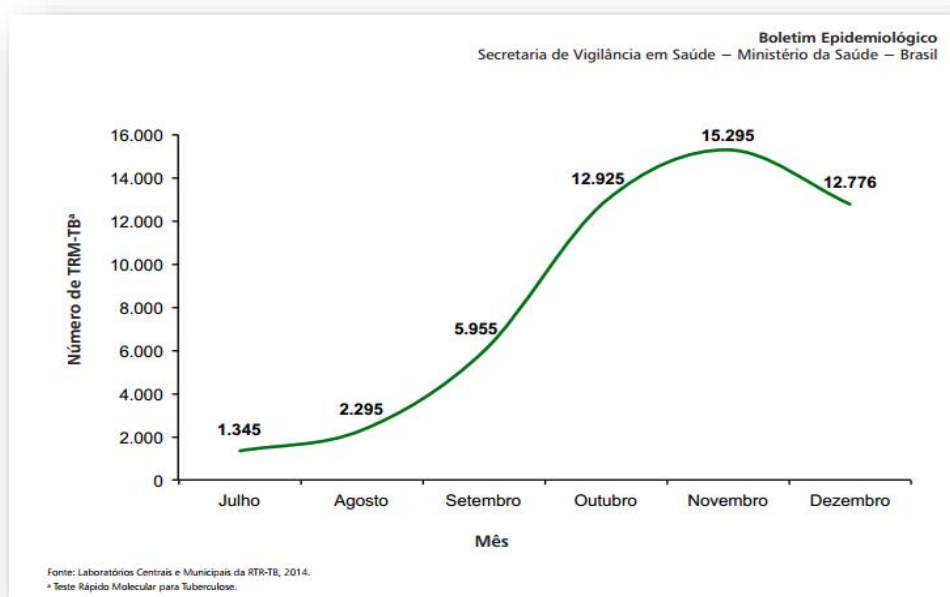
O teste rápido molecular (TRM) Xpert MTB/Rif realizado na plataforma GeneXpert® (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) é um teste molecular para a detecção simultânea de MTB e resistência à rifampicina, indicado para laboratórios que realizam baciloscopias. O sistema é formado por uma plataforma GeneXpert®, um computador simples e cartuchos descartáveis. O teste é baseado em um sistema automatizado com metodologia PCR em tempo real, método molecular que consiste na amplificação de uma sequência do material genético do organismo a partir de quantidades pequenas de DNA, permitindo a detecção de fragmentos de DNA ao longo da reação. Utiliza sondas de hidrólise do tipo molecular beacons para a detecção de MTB e resistência à rifampicina e seus resultados são liberados em aproximadamente duas horas. O teste Xpert MTB/RIF é utilizado em amostras de pacientes com suspeita clínica e que realizam primeiro diagnóstico (BRASIL, 2011; BOHEME, et al., 2011; STEINGART et al., 2014). Já resistência à rifampicina pode ser considerada como um marcador para tuberculose resistente a múltiplos fármacos (TB-MDR), caracterizada por resistência pelo menos à rifampicina e isoniazida. Pacientes que desenvolvem resistência à rifampicina têm baixa perspectiva de sucesso com o tratamento de primeira linha, o que torna necessária a adoção do tratamento de segunda linha, que utiliza

medicamentos com maior toxicidade, custo superior e requerem tratamentos prolongados. A adoção do tratamento adequado diminui as chances de falha no tratamento, a transmissão da doença e seleção de bacilos resistentes é interrompida (CARVALHO et al. 2007).

O teste XpertMTB/RIF vem sendo estudado quanto a sua agilidade em processar os resultados e eficiência no diagnóstico da TB. Em estudos multicêntricos, o teste apresentou sensibilidade de 90% em amostras com baciloscopia positiva e especificidade de 99,% (BOEHME et al., 2010; BOEHME et al., 2011; STEINGART et al., 2014; BRASIL, 2015).

Visando acelerar o diagnóstico da TB e a identificação da resistência à rifampicina e considerando as dificuldades atuais com relação ao tempo e sensibilidade dos métodos tradicionais, o TRM Xpert MTB/RIF vem sendo implementado em diversos serviços de saúde em todo o mundo, uma vez que a detecção precoce do bacilo e da resistência a rifampicina e a terapia efetiva são fundamentais para o controle da TB. No ano de 2014, uma das estratégias do Programa Nacional de Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde do Brasil foi a disponibilização do teste para estados e municípios. O Ministério da Saúde adquiriu 160 equipamentos de TRM –TB, destes, 148 foram destinados a 125 laboratórios de 92 municípios que compõem a Rede de Teste Rápido para Tuberculose (RTR-TB), sendo que todas as unidades da Federação estão incluídas na rede RTR –TB. Mais 12 equipamentos foram destinados à pesquisa em nove municípios. Desde a implementação do GeneXpert MTB/RIF no Brasil, foram realizados aproximadamente 8 mil testes por mês, no período de julho a dezembro de 2014, para primeiro diagnóstico da TB, uma vez que o *kit* não é útil para controle do tratamento (Figura 3) (BRASIL, 2015).

Figura 3. Teste molecular rápido de tuberculose realizado para os possíveis casos novos, Rede de Teste Rápido para Tuberculose, Brasil, julho a dezembro de 2014.



Fonte: BRSIL, 2015.

O Laboratório de Saúde Pública do Município de Florianópolis (LAMUF), responsável, no município de Florianópolis, pelo diagnóstico de TB, recebeu o equipamento para a realização do teste molecular Rápido GeneXpert MTB/RIF no ano de 2014. Nesse laboratório são realizadas três metodologias para diagnóstico da TB: baciloscopia, cultura e o TMR - GeneXpert MTB/RIF. Para todas as amostras que chegam ao LAMUF, tanto para diagnóstico quanto para controle do tratamento, são realizados os métodos de baciloscopia e cultura. Já o teste Xpert MTB/RIF é realizado apenas nas amostras para primeiro diagnóstico da TB. Em caso de crescimento bacilar na cultura, as amostras são enviadas ao Laboratório de Referência Estadual – Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC) – para realização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos.

O presente estudo objetivou fazer uma avaliação inicial da implementação do TMR-GeneXpert MTB/RIF na agilidade do diagnóstico da TB no município de Florianópolis.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os dados da utilização dos Testes Rápidos Moleculares TRMs GeneXpert MTB/RIF no programa de controle da tuberculose no Laboratório de Saúde Pública do Município de Florianópolis/SC (LAMUF) referentes ao ano de 2015.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o fluxo de amostras encaminhadas para diagnóstico de tuberculose no LAMUF;
- Descrever a rotina diagnóstica para tuberculose no LAMUF;
- Comparar os resultados das culturas em meio sólido Ogawa-Kudoh com o TRM-GeneXpert MTB/RIF quanto à agilidade do diagnóstico e detecção de resistência à rifampicina;
- Avaliar redução do tempo de início do tratamento alternativo para pacientes com resistência à rifampicina detectada pelo TRM.

1.3. METODOLOGIA

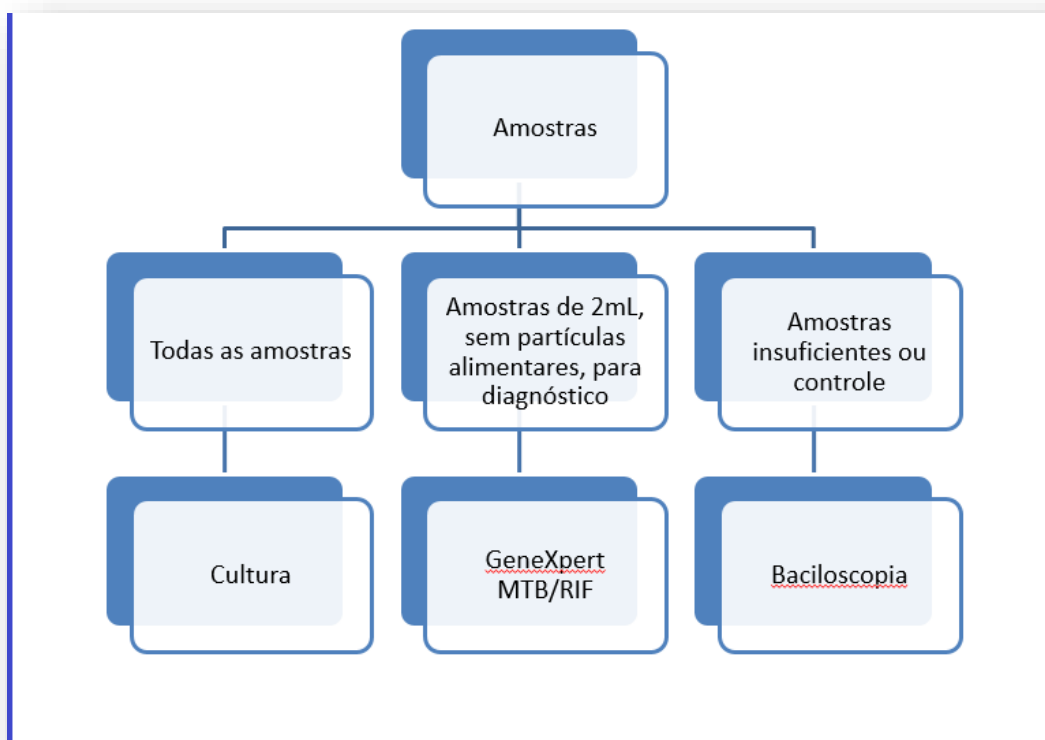
1.3.1. FLUXO DE AMOSTRAS

O LAMUF recebe amostras de escarro de todos os postos de saúde da Prefeitura Municipal de Florianópolis, de acordo com protocolo estabelecido. Após coleta do material em casa, a amostra é entregue pelo paciente no Posto de Saúde mais próximo da sua residência, no período da manhã. Após recebimento por um profissional e identificação da amostra, é solicitado ao LAMUF o recolhimento da amostra. A coleta do material pelo LAMUF é realizada a partir das dez horas da manhã com as amostras já acondicionadas em caixas térmicas. No período da tarde as amostras são acondicionadas sob refrigeração (2ª a 8°C) para a realização dos procedimentos laboratoriais.

1.3.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Rotina para diagnóstico da TB no LAMUF, procedimentos (Figura 4):

Figura 4. Fluxograma dos procedimentos realizados com amostras de escarro, recebidas pelo LAMUF.



- GeneXpertMTB/RIF: em amostras com quantidade suficiente de escarro (2 mL), pouca saliva, sem restos alimentares e somente para diagnóstico;
- Baciloscopia: a lâmina é feita quando as amostras são insuficientes para a realização no Xpert MTB/RIF ou para amostras para controle de tratamento.
- Cultura: são semeadas todas as amostras em meio Ogawa-Kudoh.

Após a leitura do resultado do TMR- Xpert MTB/RIF ou da baciloscopia, os resultados foram anotados no livro de controle de tuberculose e liberados no sistema *online*, que permite a visualização do resultado nos diferentes postos de saúde do município.

1.3.3. BACILOSCOPIA

A baciloscopia foi realizada em esfregaço de lâmina do material biológico, com coloração de Ziehl-Neelsen, de acordo com o protocolo recomendado no Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008).

Na técnica de Ziehl-Neelsen, primeiramente a amostra foi corada com fucsina quente, depois descorada com álcool-ácido e, contracorada com azul de metileno. A parede celular das micobactérias possui elevada concentração de lipídios e confere resistência à descoloração por álcool-ácido, deixando os bacilos tonalizados na cor rosa (BRASIL, 2008)

A leitura das lâminas e a interpretação dos resultados foram feitas segundo o Manual de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias. Os BAAR foram pesquisados com objetiva de 100X e os resultados expressos em cruces, da seguinte maneira: 3+ (+++) representam a presença de mais de 10 bacilos por campo, em 20 campos lidos; 2+ (++) correspondem a 1 a 10 bacilos por campo, em 50 campos; 1+ (+) corresponde a um total de 10 a 99 bacilos em 100 campos. A presença de 1 a 9 bacilos em 100 campos foi relatada com o número exato de bacilos encontrados; já a ausência de bacilos em 100 campos representa um resultado negativo (BRASIL, 2008).

1.3.4. CULTURA

As amostras de escarro foram cultivadas em meio sólido Ogawa-Kudoh, utilizando-se kit comercial que contém o meio de cultura acompanhado de solução descontaminante de NaOH 1N (Laborclin®, Brasil), de acordo com instruções do fabricante. O procedimento foi realizado em duplicata e os meios foram incubados em estufa a 37°C e conferidos semanalmente para observação de crescimento bacilar, até a oitava semana de incubação.

1.3.5. GeneXpert MTB/RIF

Para realização do TRM-Xpert MTB/RIF, as amostras e um reagente de amostra foram adicionadas a um tubo plástico conico de 15 ml, que foi fechado e homogeneizado em vórtex duas vezes, durante incubação de 15 minutos à temperatura ambiente. Um volume definido desta mistura (2mL) foi transferido para o cartuchode teste, que em seguida foi inserido na plataforma Xpert MTB/RIF. A partir deste momento, todas as etapas são automatizadas, gerando os resultados após aproximadamente duas horas (Figura 5) (BOHEME et al., 2010; BRASIL, 2011; HILLEMANN et al., 2011;).

Figura 5. Preparo da amostra do teste GeneXpert MTB/RIF.



Fonte: Cepheid.

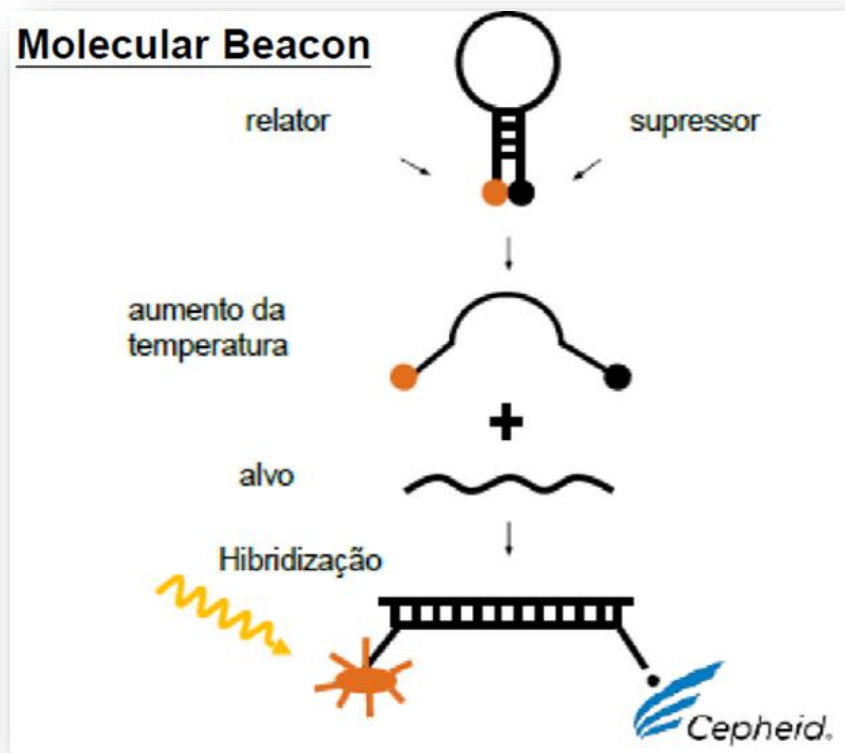
O teste GeneXpert MTB/RIF é um sistema baseado em cartuchos descartáveis e possui: câmaras para amostras e reagentes, válvula com um êmbolo e seringa, válvula rotatória para controlar a movimentação dos líquidos entre as câmaras, área de captação, concentração, lavagem e lise celular, reagentes liofilizados de PCR em tempo real e

soluções tampão de lavagem e um tubo de reação PCR integrado. Todo esse processo é automatizado (BRASIL, 2014).

O teste Xpert MTB/RIF utiliza a tecnologia molecular beacons para a detecção de sequências amplificadas de DNA num ensaio de PCR em tempo real. São utilizadas cinco sondas diferentes de hibridização de ácidos nucleicos na mesma reação multiplex.

Cada uma das cinco sondas é complementar a uma sequência alvo diferente dentro do gene *rpoB* do MTB sensível à rifampicina e é marcada com um fluoróforo de cor diferente. As sondas sobrepostas conseguem abranger toda a região de 81 pb do gene *rpoB*. As molecular beacons são sequências de oligonucleótidos utilizadas como sondas de fita simples, que contém um quencher ligado de forma covalente no final de uma das extremidades e um fluoróforo covalentemente ligado à outra extremidade. Quando livres na solução, as molecular beacons não emitem fluorescência, porém, quando localizam seu alvo, há hibridização resultando em uma nova organização conformacional, onde o fluoróforo se afasta do quencher e emite fluorescência. Quando não há alvos, as moléculas beacons não emitem fluorescência, pois o quencher, por estar próximo do fluoróforo, capta a energia (LAWN; NICOL, 2011).

Figura 6: Molecular beacons utilizados para detecção de sequências amplificadas de DNA num ensaio de PCR em tempo real.



Fonte: Cepheid.

2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após compilação dos resultados, foram avaliados os seguintes indicadores: gênero, idade, positividade do TRM-Xpert MTB/RIFe da cultura, resistência à rifampicina e tempo até detecção da positividade da cultura. Os valores de média e desvio padrão foram calculados utilizando-se o Software Microsoft Excel versão 2010.

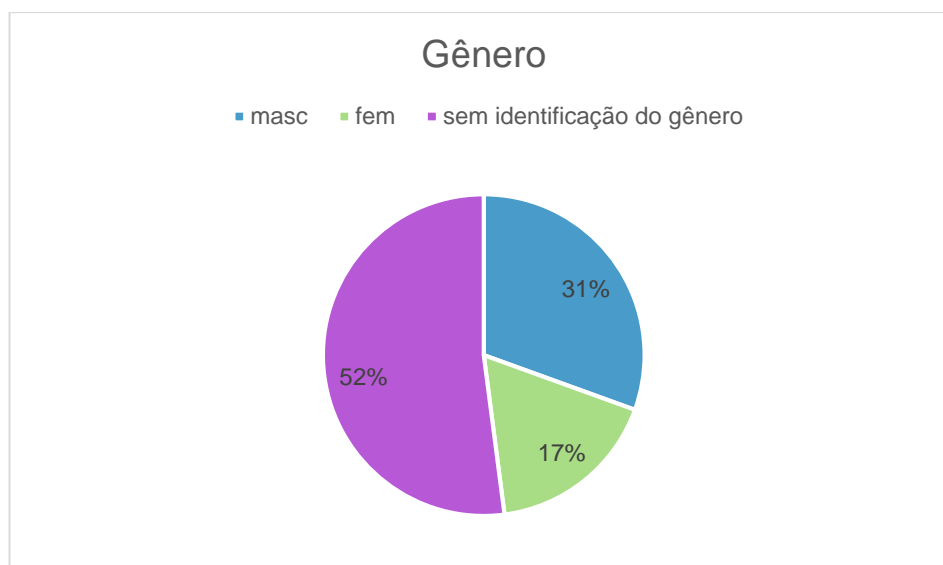
A concordância entre o TRM-Xpert MTB/RIFe a cultura foi determinada pelo teste Kappa. Para isso, utilizou-se o programa SPSS *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS software, versão 17.0, EUA). Adotaram-se como referência os valores determinados por Altman (1991), em que valores de Kappa entre 0,00-0,20 indicam concordância pobre entre os resultados, valores entre 0,21-0,40 indicam concordância razoável, valores entre 0,41-0,60 indicam concordância moderada, valores entre 0,61-0,80 indicam concordância boa e valores entre 0,81-1,0 indicam concordância excelente.

Os valores de sensibilidade, especificidade, do TRM-Xpert MTB/RIF foram calculados pela Curva ROC (*ReceiverOperatingCharacteristic*), utilizando-se a cultura como padrão ouro. Para esta análise, utilizou-se o programa MedCalc (versão 12.0.3.0, Bélgica).

3. RESULTADOS

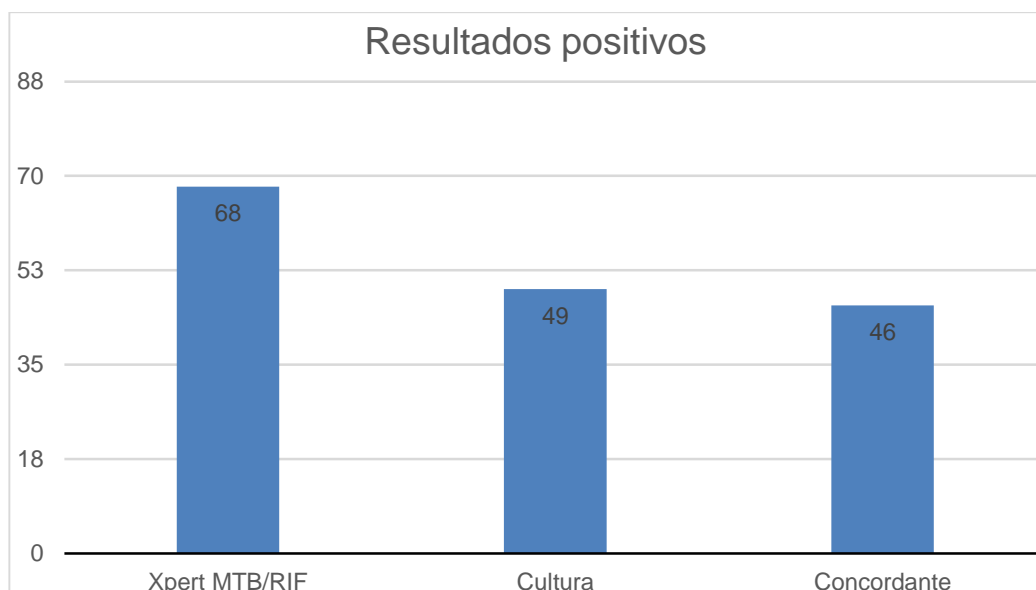
No período de janeiro a dezembro de 2015, foram recebidas 1.212 amostras de escarro para primeiro diagnóstico de tuberculose no LAMUF. Destas, 370 (30,53%) foram coletadas de pacientes do gênero masculino, 211 (17,41%) do gênero feminino e 631 (52,06%) não foram identificadas quanto ao gênero (Figura 7).

Figura 7. Gênero dos pacientes que coletaram amostras de escarro para diagnóstico de TB enviadas ao LAMUF.



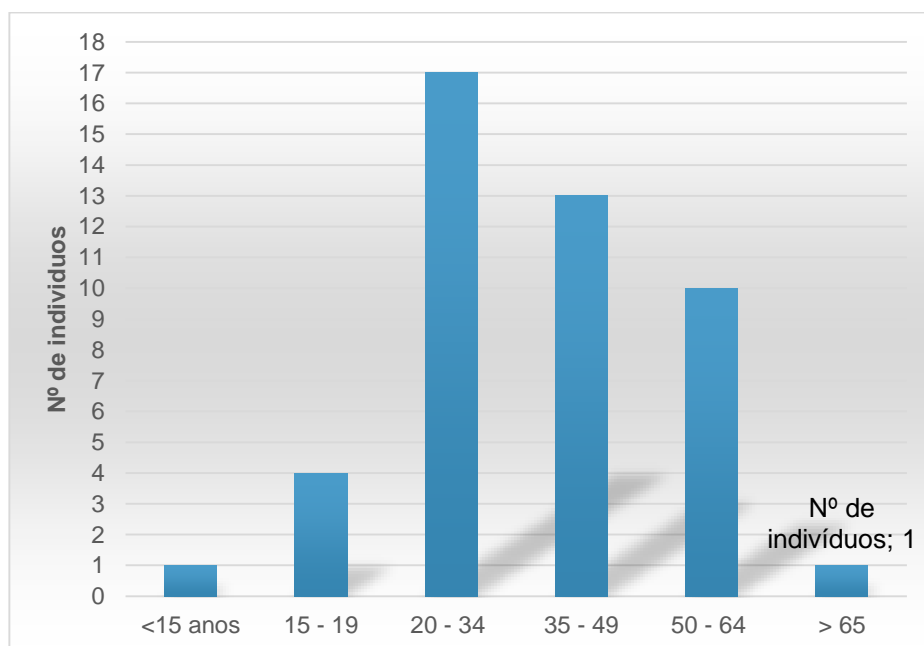
Das 1.212 amostras, 68 (5,61%) foram positivas no TRM-Xpert MTB/RIF, enquanto 49 (4,04%) foram positivas na cultura (Figura 8). Do total de amostras, 98,18% apresentaram resultados concordantes. O valor de Kappa foi de 0,798, o que indica boa concordância entre as metodologias. Em relação à cultura, o kit apresentou sensibilidade de 93,88%, especificidade de 96,36%.

Figura 8. Amostras positivas no TRM-Xpert MTB/RIF e cultura.



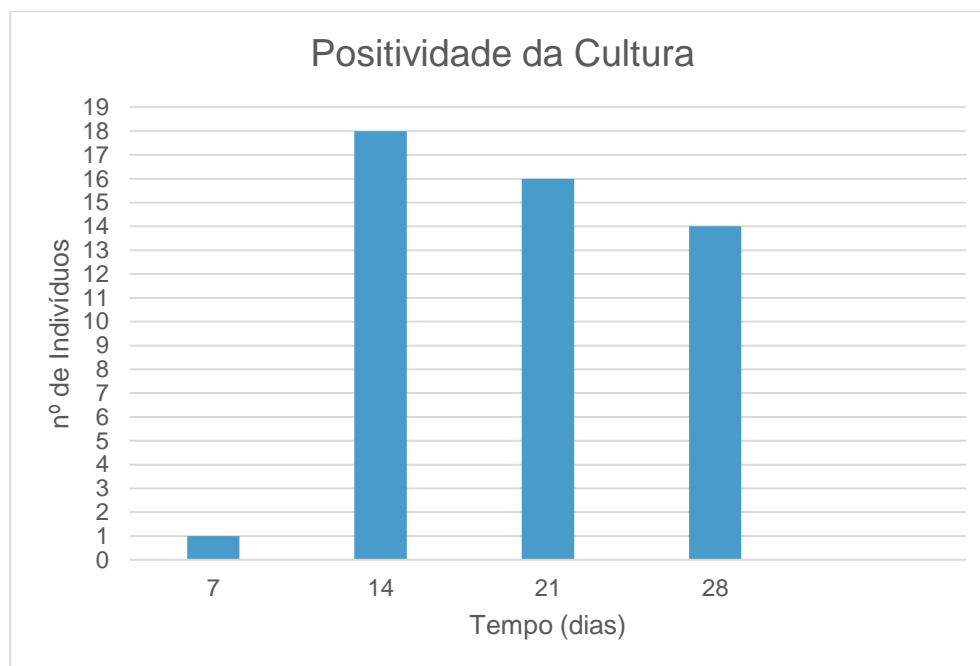
Das 49 amostras positivas na cultura, a média de idade foi de $39,08 \pm 14,4$ anos, variando de 3 a 83 anos. Entre os indivíduos dos quais se possuía informação, 61,3% eram do gênero masculino, com média de idade de $38,4 \pm 13,0$ anos, enquanto 38,7% dos pacientes eram do gênero feminino, com média de idade de $40,08 \pm 19,0$ anos. Do total, um paciente era menor de 15 anos (2,%), quatro possuíam entre 15 e 19 anos (8,2%), 17 entre 20 e 34 anos (34,7%), 15 entre 35 e 49 anos (30,6%), 11 entre 50 e 64 anos (22,5%) e uma pessoa tinha 83 anos (2,%) (Figura 9).

Figura 9: Distribuição por faixa etária dos 49 pacientes cujas amostras foram reagentes na cultura para TB.



Dentre as 49 amostras positivas na cultura, 1 (2,%) apresentou resultado positivo em sete dias, 18 (36,7%) foram positivas em 14 dias, 16 (32,7%) em 21 dias e 14 (28,6%) em 28 dias (Figura 10).

Figura 10: Total de dias para a positividade das culturas.



Em relação à resistência à rifampicina sete amostras foram positivas no TRM-Xpert MTB/RIF. Destas, três amostras também pertencem ao grupo de 46 amostras positivas no TRM-Xpert MTB/RIF concordantes com a cultura. Quando o resultado dessas três amostras foi comparado ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos realizado pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC), verificou-se que uma teve a análise cancelada pelo LACEN/SC devido a contaminação e as outras duas tiveram a resistência à rifampicina confirmada pelo método MGIT™ (Becton, Dickinson and Company). As outras quatro amostras em que foi detectada a resistência à rifampicina pelo TRM-Xpert MTB/RIF não apresentaram cultura positiva. Ainda, dessas quatro amostras, uma foi positiva tanto no TRM-Xpert MTB/RIF quanto na baciloscopia, porém foi negativa na cultura.

4. DISCUSSÃO

A detecção precoce da TB é fundamental para interromper a transmissão do bacilo e dessa forma reduzir a taxa de mortalidade. Entretanto, o controle da TB muitas vezes é dificultado devido aos métodos de diagnósticos lentos e pouco sensíveis, principalmente para a detecção de MTB em pacientes com imunodeficiência e detecção de resistência aos fármacos. (BOHEME et al., 2010). No ano de 2014, estratégias foram adotadas pelo Ministério da Saúde do Brasil, visando aumentar e melhorar a sensibilidade do sistema de vigilância da TB e agilizar o diagnóstico da doença. Uma dessas estratégias foi a implantação da rede de teste rápido molecular para TB (TRM – TB), em que o TRM-Xpert MTB/RIF foi implementado em busca da eficácia do diagnóstico da tuberculose e detecção precoce da resistência à rifampicina. Quanto antes o paciente infectado inicie o tratamento, suas chances de cura são aumentadas e diminui significativamente a possibilidade de disseminação da doença.

A plataforma utilizada nesse trabalho é de fácil execução, por ser um sistema automatizado, fornecendo resultados em cerca de duas horas após o início do teste (STEINGART et al., 2014). Em trabalho realizado anteriormente, Boheme e colaboradores (2010) chegaram à conclusão de que a simplicidade do TRM-Xpert MTB/RIF, que utiliza um único profissional treinado, 15 minutos de preparo da amostra e sua leitura automática e inequívoca, o torna uma metodologia vantajosa. Contudo, é necessária uma calibração anual do equipamento, o que representa um desafio para implementação da plataforma em alguns laboratórios, além de possuir uma tecnologia sofisticada, o que torna o teste mais caro. No entanto, o TRM-Xpert MTB/RIF pode ser menos oneroso do que a implementação de cultura e teste de susceptibilidade aos fármacos.

Neste estudo, o TRM-Xpert MTB/RIF foi avaliado em relação à cultura sólida em meio Ogawa-Kudoh e apresentou sensibilidade de 93,88% e especificidade de 96,36%. Dentre as 1.212 amostras, a cultura identificou 49 como positivas, enquanto o TRM-Xpert MTB/RIF foi capaz de identificar 68 amostras positivas. Dessas 68 amostras, 22 não concordaram com a metodologia padrão ouro, o que pode sugerir a obtenção de resultados falso-positivos. Isto pode ter ocorrido devido à testagem de amostras provenientes de pacientes que estão em tratamento ou que apresentam TB prévia e que podem conter bacilos mortos, detectados pelo TRM-Xpert MTB/RIF. Em nota o

Programa Nacional para Controle da Tuberculose indica o TRM-Xpert MTB/RIF apenas para o diagnóstico e resultados falso-positivos têm sido reportados em amostras de indivíduos previamente tratados (BRASIL, 2013; BOYLES, et al., 2014)

Em estudo realizado por Boheme e colaboradores (2010), o TRM-Xpert MTB/RIF foi utilizado para diagnosticar pacientes com multirresistência de quatro países, Peru, Azerbaijão, África do Sul e Índia, com o objetivo de avaliar o desempenho do teste. No estudo, foram utilizadas amostras de 1.730 pacientes e o teste apresentou bons resultados em relação ao padrão ouro. Quando comparado com a metodologia da cultura, o TRM-Xpert MTB/RIF apresentou sensibilidade de 97,6% e especificidade de 99,2%. Em um trabalho realizado Liverpool por Steingart e colaboradores (2014) encontraram sensibilidade de 89% e especificidade de 99% no Xpert® MTB/RIF quando comparada à baciloscopia. Concluíram que o TRM-Xpert MTB/RIF possui maior sensibilidade para a detecção da TB em amostras de pacientes com baciloscopia positiva.

A baciloscopia é um método de baixo custo e utilizado no mundo todo para diagnóstico da TB. No Brasil a baciloscopia, pela sua utilidade, continuará sendo utilizada em paralelo ao TRM-Xpert MTB/RIF e nas situações às quais o teste molecular não se aplicacomo, por exemplo, em amostras com volume insuficiente para o processamento no TRM e para amostras controle. Uma vez que o TRM-Xpert MTB/RIF detecta DNA de MTB, o teste pode apresentar resultados positivos por tempo indefinido, impossibilitando a comprovação daeficiência do tratamento. Portanto, fica evidente a importância da realização da baciloscopia, para avaliar e acompanhar a evolução do tratamento. Já a cultura e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) são procedimentos recomendados a serem realizados para todos os pacientes positivos no TRM-Xpert MTB/RIF. O TSA é realizado para a comprovação da existência da resistência à rifampicina detectada pelo TRM-Xpert MTB/RIF. Todas essas estratégias formam um conjunto importante para auxiliar no controle da TB (BRASIL, 2015).

Dos casos nos quais a cultura foi positiva e a informação de gênero fornecida, observou-se uma prevalência do gênero masculino (61,3%) em relação ao gênero feminino (38,7%). Dados semelhantes foram reportados pela Organização Mundial da Saúde - OMS (WHO, 2016) sobre novos casos registrados no Brasil, com 67,85% e 32,14% do gênero masculino e feminino, respectivamente. Grande parte dos indivíduos

do presente estudo possui mais que 14 anos de idade (97,95%), dado que corroboramos reportados no relatório emitido pela OMS, em que 90,47% dos novos casos registrados no Brasil em 2015 correspondem a pacientes com idade acima de 14 anos. Observando-se a estratificação da idade dos indivíduos do presente estudo, houve um predomínio de pacientes entre 20 e 34 anos (34,69%) e entre 35 e 49 anos (30,61%). Esses dados estão de acordo com os dados mundiais reportados pela OMS, que indicam que a TB acomete comumente o gênero masculino e afeta principalmente adultos em idade economicamente ativa (UN, 2015; WHO, 2016).

Dentre os dados obtidos neste estudo, verificou-se que o tempo médio de detecção de MTB pelo TRM-Xpert MTB/RIF foi inferior a um dia (cerca de duas horas), em comparação com 20 dias (7 – 28 dias) para a cultura sólida em meio Ogawa-Kudoh. No entanto, ao observarmos a logística de transporte de amostras entre os postos de coleta da prefeitura municipal e o LAMUF, o tempo médio de liberação dos resultados varia entre 24 h e 48 h. A utilização do TRM-Xpert MTB/RIF contribuiu para a redução do tempo médio do início do tratamento para pacientes com TB. Em estudo realizado por Boheme e colaboradores (2011) foram analisados adultos com suspeita de TB ou TB-MDR, que apresentavam tosse com duração mínima de duas semanas em centro de saúde urbanos, na África do Sul, Peru e Índia e instalações de triagem no Azerbaijão e nas Filipinas e uma sala de emergência em Uganda. Foram avaliados, para as técnicas utilizadas, indicadores de robustez, comparados tempo de detecção, notificação e tratamento. Observou-se que o tempo médio para detecção da TB, utilizando o TRM-Xpert MTB/RIF é inferior a um dia em comparação com 30 dias (23 – 43) para cultura sólida e 16 dias (13-21) para cultura líquida. A utilização do TRM-Xpert MTB/RIF reduziu o tempo médio de início do tratamento da TB de 56 dias (39 – 81) para 5 dias (2 – 8). Concluiu-se ainda que o kit pode ser usado em laboratórios com poucos recursos, facilitando o acesso dos pacientes ao diagnóstico rápido e preciso e assim, diminuindo significativamente a morbidade associada à lentidão do diagnóstico.

A resistência à rifampicina pode ser considerada como um marcador para TB-MDR. Uma vez que a resistência geralmente só é detectada após a observação de falha no tratamento, que ocorre meses após o início da terapia medicamentosa, a detecção pelo TRM possibilita a adoção do tratamento adequado de forma mais rápida. Além disso, a rápida detecção de resistência evita tratamentos com fármacos inadequados, reduz a exposição a efeitos colaterais causadas pelos fármacos, fornece

diagnóstico correto e conseqüentemente acelera o tratamento e diminui a incidência da TB (CARVALHO, 2007; BRASIL, 2011; BOHEME, et al., 2011). Em estudo realizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2014), o TRM-Xpert MTB/RIF detectou a resistência à rifampicina com 99,1% de sensibilidade, levando à adoção do tratamento adequado aos pacientes diagnosticados. No presente estudo, o TRM-Xpert MTB/RIF identificou sete amostras com a bactéria resistente à rifampicina. Dessas, duas amostras foram confirmadas com o teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método MGIT™ (*Becton, Dickinson and Company*), no LACEN/SC, e uma amostra teve sua análise cancelada (no LACEN/SC) devido à contaminação do teste de sensibilidade. As três amostras resistentes à rifampicina correspondem a 6,1% dos casos de TB detectados no estudo, o que é um número importante visto a taxa de isolados MDR na Grande Florianópolis de 6% (NOGUEIRA, 2012). Além disso, o resultado da amostra que teve a análise do teste de sensibilidade cancelada pelo LACEN/SC pode ter sido particularmente importante para adoção do tratamento adequado, visto que a cultura positiva já é um indicador de doença ativa e neste caso a detecção da resistência deve ser considerada.

As outras quatro amostras que apresentaram resultado positivo para resistência à rifampicina no TRM-Xpert MTB/RIF, mas que não apresentaram crescimento na cultura pode corresponder a resultados falso-positivos no TRM, caso sejam amostras de pessoas tratadas anteriormente. Pacientes em tratamento ou que tiveram TB prévia podem apresentar bacilos mortos no escarro, que são detectados pelo método molecular. Esta explicação justifica principalmente um desses quatro casos, em que a baciloscopia foi positiva, mas a cultura foi negativa (BOHEME, 2010).

De maneira global, a necessidade da detecção mais rápida e o aumento de casos com resistência a múltiplos fármacos levaram à pesquisa de novas metodologias para diagnóstico da TB. Infelizmente, os testes moleculares desenvolvidos ainda não estão amplamente distribuídos, presente apenas em alguns centros de referência. O TRM-Xpert MTB/RIF, por ser um teste automatizado de extração, amplificação e detecção de DNA que ocorre dentro de um cartucho que não é reaberto, confere a ele poucas chances de contaminação (BOHEME, 2010). Em estudo recente, Banada e colaboradores (2010) confirmaram que o TRM-Xpert MTB/RIF, diminui a formação de aerossóis em comparação com o preparo de esfregaços. Todas essas características de simplicidade e segurança na utilização conferem uma detecção da TB e resistência à

rifampicina que agiliza o diagnóstico sem a necessidade de laboratórios com equipamentos, expertise profissional e estrutura de biossegurança avançados. No entanto, a necessidade de um volume específico de amostra, a calibração anual e por possuir tecnologia avançada e patenteada, o torna uma metodologia mais onerosa do que a baciloscopia, por exemplo (BOHEME, 2010). Contudo, o TRM-Xpert MTB/RIF realizado na plataforma GeneXpert® se mostrou, em diversos estudos, capaz de promover o diagnóstico rápido e detecção de resistência à rifampicina, com alta sensibilidade e especificidade, proporcionando tratamento rápido e adequado aos pacientes infectados pelo bacilo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

1. No LAMUF, no período de janeiro a dezembro de 2015, a taxa de amostras positivas para TB, considerando a cultura como o padrão ouro no primeiro diagnóstico, foi de 4%;
2. Das 49 amostras positivas na cultura e entre os indivíduos dos quais se possuía informação, 61,30% eram do gênero masculino, com média de idade de $38,4 \pm 13,0$ anos;
3. Os pacientes com TB pertencem predominantemente às faixas etárias de 20 – 34 anos (34,70%) e 35 – 49 anos (30,60%);
4. O TRM-Xpert MTB/RIF apresentou valor de Kappa de 0,798 em relação à cultura, o que indica boa concordância entre os métodos. O kit apresentou sensibilidade de 93,88% e especificidade de 96,36%.
5. Entre sete amostras resistentes à rifampicina, apenas duas foram concordantes em ambos os testes (42,90%), sendo que uma delas teve a análise cancelada pelo LACEN/SC. Das outras quatro amostras, nenhuma apresentou cultura positiva e uma foi positiva na baciloscopia.
6. O tempo médio de detecção do TRM-Xpert MTB/RIF foi inferior a um dia em comparação com 20 dias (7 – 28 dias) para a cultura.
7. O presente estudo permitiu a avaliação inicial das vantagens da implementação do TRM-Xpert MTB/RIF no município de Florianópolis, demonstrando que a

utilização do TRM-Xpert MTB/RIF possibilitou a redução do tempo médio para início do tratamento para pacientes com TB.

REFERÊNCIAS

ALTMAN, D. G. *Practical statistics for medical research*. London: Chapman and Hall, 1991.

BANADA, Padmapriya P.; SIVASUBRAMANI, Satheesh K.; BLAKEMORE, Robert. Containment of Bioaerosol Infection Risk by the Xpert MTB/RIF Assay and Its Applicability to Point-of-Care Settings. *Journal Of Clinical Microbiology*. New Jersey, p. 1-7. out. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2953088/pdf/1053-10.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2016.

BOEHME, C. C.; NABETA, P.; HILLEMANN, D.; NICOL, M. P.; SHENAI, S.; KRAPP, F.; ALLEN, J.; TAHIRLI, R.; BLAKEMORE, R.; RUSTOMJEE, R.; MILOVIC, A.; JONES, M.; O'BRIEN, S.M.; PERSING, D. H.; RUESCH-GERDES, S.; GOTUZZO, E.; RODRIGUES, C.; ALLAND, D.; PERKINS, M.D. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *New England Journal of Medicine*, v.363, n.11, p. 1005-1015, 2010.

BOEHME, C. C.; NICOL, M. P.; NABERTA, P.; JOY, S.M.; GOTUZZO, E.; TAHIRLI, R.; GLER, M. T.; BLAKEMORE, R.; WORODRIA, W.; GRAY, C.; HUANG, L.; CACERES, T.; MEHDIYEV, R.; RAYMOND, L.; WHITE LAW, A.; SAGADEVAN, K.; ALEXANDER, H.; ALBERT, H.; COBELENS, F.; COX, H.; ALLAND, D.; PERKINS, M.D. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralized use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. *Lancet*, v.377, p. 1495-1505, 2011.

BOYLES T. H.; HUGHES J.; COX V.; MEINTJES G.; MENDELSON M. False-positive Xpert MTB/RIF assays in previously treated patients: need for caution in interpreting results, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias*. 1.ed. Brasília, 2008a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb.pdf>. Acesso em: out/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde / Fundação Nacional da Saúde. Vigilância Epidemiológica. *Informe Técnico da Tuberculose*. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_tb_julho10_certo_22_07_2010.pdf, 2010a. Acesso em: set/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde, Proposta de incorporação do Xpert MTB/RIF como teste para diagnóstico de tuberculose e para indicação de resistência a rifampicina. 49. ed. Brasil: Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos 26 p., 2014. Disponível em: <<http://www.fundacaoataulphodepaiva.com.br/wp-content/uploads/2013/03/Relatorio-XpertMTBRIF-CP5.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Editora MS, v. 44, n. 2, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos/DGITS/Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC) - Relatório nº49, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Editora MS, v. 46, n. 9, 2015.

BRASIL. Secretária de Vigilância em Saúde/MSBaciloscopia, Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008.

CARVALHO, Wânia da Silva; MIRANDA, Silvana Spíndola de; PESQUERO, Jorge Luiz. Diagnóstico de resistência do Mycobacterium tuberculosis à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Minas Gerais, v. 43, n. 1, p.1-8, mar. 07. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v43n1/03.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2016.

DIVE. Barriga Verde: Boletim Epidemiológico. Florianópolis: [s.n.], 2016.

FERREIRA, A. et al. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. Revista Brasileira de Epidemiologia. Natal, p. 142-149. ago. 2005. Disponível em: <<http://www.scielosp.org/pdf/rbepid/v8n2/06.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

GRIFFITH, D. E.; AKSAMIT, T.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; CATANZARO, A.; DALEY, C.; GORDIN, F.; HOLLAND, S. M.; HORSBURGH, R.; HIOTT, G.; IADEMARCO, M. F.; ISEMAN, M.; OLIVIER, K.; RUOSS, S.; von REYN, C.F.; WALLACE, R. J.; WINTHROP, K. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of non-tuberculous mycobacterial diseases. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v.175, n.4, p. 367-416, 2007.

HILLEMANN, D., et al. Rapid Molecular Detection of Extrapulmonary Tuberculosis by the Automated GeneXpert MTB/RIF System. Journal of Clinical Microbiology, [s.l.], v. 49, n. 4, p.1202-1205, 00 jan. 2011. American Society for Microbiology. DOI: 10.1128/jcm.02268-10. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/49/4/1202.full.pdf+html>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

LAWN, Stephen D; NICOL, Mark P. Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. Future Microbiology. London, p. 1-26. jan. 2012.

NOGUEIRA, Christiane Lourenço. DIAGNÓSTICO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE CEPAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS NO ESTADO DE SANTA CATARINA. 2012. 235 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

PALOMINO, J. C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *European Respiratory Journal*, Redwood, v. 26, n. 2, p. 339-350, 2005.

PANDOLFI, J.R.; MALASPINA, A.C.; SANTOS, A.C.B.; SUFFYS, P.N.; OELLEMANN, M.A.C.; VALENTINI, S.R.; LEITE, C.Q.F. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, p. 251-257, 2007.

PARSONS, L.; SOMOSKÖVI, A.; GUTIERREZ, C.; LEE, E.; PARAMASIVAN, C.N.; ABIMIKU, A.; SPECTOR, S.; ROSCIGNO, G.; NKENGASONG, J. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 2, p. 314-350, 2011.

STEINGART KR, SCHILLER I, HORNE DJ, Pai M, BOEHME CC, DENDUKURI N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, Issue 1. Art. No.: CD009593. DOI: 10.1002/14651858.CD009593.pub3.

TORTOLI, E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacterial infections. *Clinical Microbiology and Infections*, v. 15, p. 906-910, 2009.

UNITED NATIONS. The Millennium Development Goals Report. United Nations New York: [s.n.], 2015.

WHO – World Health Organization Global Tuberculosis Report, 2014a. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=1. Acesso em: ago/2016.

WHO- World Health Organization Global Tuberculosis Report, 2015. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1. Acesso em: ago/2016

WHO- World Health Organization Global Tuberculosis Report, 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf?ua=1>. Acesso em: nov/2016