



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECÇÃO HIV / AIDS E HEPATITES
VIRAIS
MESTRADO PROFISSIONAL – PPGHIV/HV

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Prevalência da *Micobacterium tuberculosis* em pacientes HIV
em relação à sensibilidade da Rifampicina no Genexpert do
HUGG

Nicola Cetrangolo

RIO DE JANEIRO
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECÇÃO HIV / AIDS E HEPATITES
VIRAIS
MESTRADO PROFISSIONAL – PPGHIV/HV

**Prevalência da *Micobacterium tuberculosis* em pacientes HIV
em relação à sensibilidade da Rifampicina no Genexpert no
HUGG**

Nicola Cetrangolo

Sob a Orientação do Professor
Dario J. Hart P. Signorini

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
Grau de Mestre em Infecção
HIV/AIDS e Hepatites Virais na
Área de Doenças Infecciosas e
Parasitárias.

Rio de Janeiro
2018

Catálogo informatizado pelo(a) autor(a)

C423 CETRANGOLO, Nicola
Prevalência da M. tuberculosis em paciente HIV
resistente à Rifampicina no PCR do GeneXpert do
HUGG. / Nicola CETRANGOLO. -- Rio de Janeiro, 2018.
39

Orientador: Dario José Hart Pontes Signorini.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Medicina, 2018.

1. Tuberculose. 2. Resistência à Rifampicina. 3.
Reação de polimerase em cadeia. 4. GeneXpert. I.
Signorini, Dario José Hart Pontes, orient. II.
Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa - PROPG
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS
Programa de Pós-Graduação em Infecção HIV/AIDS e Hepatites Virais - PPGHIV/HV

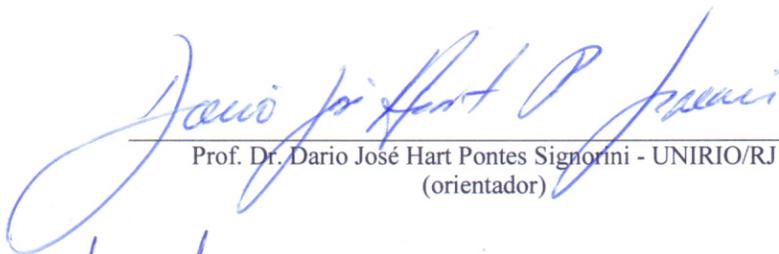
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Nicola Cetrangolo

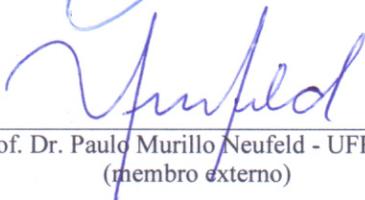
"Prevalência da *Micobacterium tuberculosis* em pacientes HIV em relação à sensibilidade da Rifampicina no Genexpert do HUGG"

Aprovado(a) pela Banca Examinadora

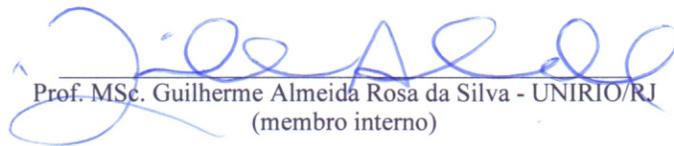
Rio de Janeiro, 23 / 06 / 2018



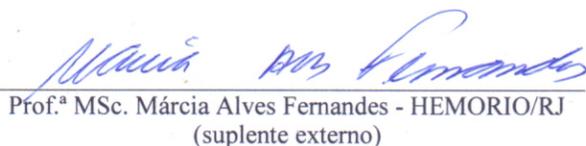
Prof. Dr. Dario José Hart Pontes Signorini - UNIRIO/RJ
(orientador)



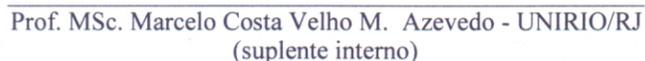
Prof. Dr. Paulo Murillo Neufeld - UFRJ/RJ
(membro externo)



Prof. MSc. Guilherme Almeida Rosa da Silva - UNIRIO/RJ
(membro interno)



Prof.ª MSc. Márcia Alves Fernandes - HEMORIO/RJ
(suplente externo)



Prof. MSc. Marcelo Costa Velho M. Azevedo - UNIRIO/RJ
(suplente interno)

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

AIDS – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

APS – Atenção Primária à Saúde

BAAR – Bacilo Álcool- Ácido Resistente

BK – Bacilo de Koch

CD4 – Linfócito com receptor CD4

CD8 - Linfócito com receptor CD8

CYP 450 – citocromo P 450

CMB – Clínica Médica B

DNA – Ácido desoxirribonucléico

HAART – Tratamento antiretroviral de elevada eficácia

HIV - Vírus *da Imunodeficiência Humana*

HUGG – Hospital Universitário Graffreé e Guinle

Gene katG – gene da catalase peroxidase

Gene rpoB – gene codificador de proteína

MT - Mycobacterium tuberculosis

PC - Controle de verificação da sonda

PCR – Reação de polimerase em cadeia

PNCT – Programa Nacional de Controle da Tuberculose

RT-PCR (transcriptase reversa-PCR) em tempo real

RIF – rifampicina

SIDA-Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SPC - Controle de processamento da amostra

TARV - Terapia antiretroviral

TB – Bacilo da Tuberculose

TRM-TB-Teste rápido molecular para tuberculose

TB-MR-Tuberculose Multirresistente

TABELAS

Tabela 1-Frequência de MT no GeneXpert nos pacientes portadores do HIV no HUGG entre março 2015 a março de 201624

Tabela 2-Frequência de BK na Baciloscopia nos 85 pacientes portadores do HIV no HUGG entre março de 2015 a março de 2016.24

Tabela 3-Frequência de MT na cultura nos pacientes portadores do HIV no HUGG entre março de 2015 a março de 201625

Tabela 4-Frequência do teste de sensibilidade do MT à Rifampicina no Genexpert nos pacientes portadores do HIV no HUGG entre março de 2015 a março de 2016.....25

Tabela 5 - Frequência da Cor nos 85 pacientes portadores do HIV no HUGG entre março de 2015 a março de 2016.....25

Tabela 6 - Frequência do Sexo nos 85 pacientes portadores do HIV no HUGG Entre março de 2015 a março de 2016.....26

Tabela 7 - Frequência da via de Transmissão nos 85 pacientes portadores do HIV no HUGG entre março de 2015 a março de 2016..... 26

Tabela 8 - Frequência das sintomatologias nos 85 pacientes portadores do HIV no HUGG entre março de 2015 a março de 2016.....26

Tabela 9 - Frequência das Idades nos 85 pacientes portadores do HIV no HUGG entre março de 2015 a março de 201627

Resumo

A tuberculose é uma doença causada por uma micobactéria do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Estima-se que boa parte da população de portadores do HIV, esteja infectada.

Com este trabalho, pretende fazer uma abordagem da doença, analisando os desafios colocados pela sua identificação e a sensibilidade aos fármacos, cuja investigação se encontra necessariamente em constante evolução pelas exigências impostas pelo preocupante aparecimento de estirpes resistentes, tornando o tratamento cada vez menos eficaz. Pretende-se, assim, salientar a importância da tuberculose resistente à rifampicina pela técnica da biologia molecular em tempo real (GeneXpert). A detecção rápida e a resistência contribuem para prevenir a transmissão e orientar na escolha inicial das drogas para o tratamento da tuberculose. A PCR em tempo real (RT-PCR) detecta todas as mutações do *Mycobacterium tuberculosis* (MT) que ocorrem na região de 81 pares de bases do gene *rpoB*, sítio de ligação ribossomal responsáveis pela resistência à rifampicina (RIF) .

A sensibilidade da RT-PCR na detecção de resistência à rifampicina individualmente, foi de 100%. A especificidade para o teste foi de 100%. A maioria das mutações foi no gene *rpoB*.

Nossos resultados demonstraram ser possível detectar a resistência à RIF em torno de 2 horas, com alta sensibilidade. O perfil dos nossos pacientes portadores do HIV do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, com o isolamento do *Mycobacterium tuberculosis* apresentou 100% de sensibilidade a rifampicina, não havendo necessidade de introduzir outro fármaco ao teste de sensibilidade no GeneXpert.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, PCR em tempo real (RT-PCR); resistência à droga rifampicina. GeneXpert.

Abstract

Tuberculosis is a disease caused by a *Mycobacterium tuberculosis* complex. It is estimated that a large part of the HIV-positive population is infected, although most do not show symptoms of the disease.

This work intends to approach the disease, analyzing the challenges posed by its identification and the sensitivity to drugs, whose research is necessarily in constant evolution by the requirements imposed by the worrisome appearance of resistant strains of drugs that become so each less effective. It is therefore intended to highlight the importance of rifampicin resistant tuberculosis by the technique of molecular biology in real time (GeneXpert), which goes through the in-depth knowledge of the mechanisms that give rise to such resistance, is the essential starting point for the introduction of new drugs in the GeneXpert sensitivity test. This is aimed at reducing the mortality of these patients. Rapid detection and resistance help to prevent transmission and guide the initial choice of drugs for the treatment of tuberculosis. Real-time PCR (RT-PCR) detects all *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) mutations that occur in the base parts region of the *rpoB* gene, the ribosomal binding site responsible for rifampicin resistance (RIF).

The sensitivity of RT-PCR in the detection of resistance to rifampicin individually, were 100%. The specificity for the test was 100%. Most mutations in the *rpoB* gene.

. Our results at RT-PCR can detect resistance to RIF around 2 hours with high sensitivity. The profile of our HIV patients at the Gaffrée and Guinle University Hospital, with the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*, showed 100% sensitivity to rifampicin, and there was no need for this service to introduce another drug to the GeneXpert sensitivity test.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, real-time PCR (RT-PCR); drug resistance rifampicin. GeneXpert.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	
1.1-Histórico	8
1.2-Epidemiologia	9
1.3-Transmissão	10
1.3.1-Patogênese da tuberculose	11
1.3.2-Imunologia	12
1.3.3-Co-infecção TB/HIV	13
1.4-Fisiopatologia	14
1.5-Manifestações Clínicas	15
1.6-Exames Laboratoriais	15
1.6.1-Pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR)	15
1.6.2-Princípio do teste PCR	17
1.6.3-Rifampicina	18
2-Justificativa	19
3-Objetivo do Estudo	20
3.1-Objetivo Geral	20
3.2-Objetivos Específico	20
4-Material e Métodos	20
4.1-Coleta dos dados	23
4.2- Variáveis de interesse do estudo	23
5-Resultados	23
6-Discussão	27
7-Conclusão	29
8-Anexo A	30
9-Referências	31

1. INTRODUÇÃO

1.1-Histórico

A tuberculose acompanha o homem há muito tempo, talvez, até, desde a época em que ele passava à condição de bípede.

Existem relatos de evidência de TB em ossos humanos pré-históricos encontrados na Alemanha e datados de 8.000 antes de Cristo (AC). A TB de coluna vertebral e de ossos também já foi encontrada em esqueletos egípcios de 2.500 AC. Apesar da descrição clínica da forma pulmonar poder ser confundida com outras doenças, documentos antigos hindus e chineses já descreviam quadros de uma doença pulmonar muito semelhante a TB¹.

No Brasil, alguns colonizadores jesuítas chegavam doentes, mantinham contato permanente com os índios e infectavam dezenas de nativos. Acredita-se que o padre Manuel da Nóbrega, que chegou ao Brasil em 1549, tenha sido o morador ilustre do país a morrer da doença.^{2,3}

Sendo a tuberculose uma doença infecciosa, a disseminação foi muito rápida nas grandes cidades europeias, durante a urbanização e Revolução Industrial, no século XIX. Assim como na Europa, no Brasil não foi diferente. A epidemia se tornou muito comum nas maiores cidades brasileiras. Estimativas apontam que a mortalidade por tuberculose no Brasil, em 1855, era de 1/150 habitantes.³

Em 1984, foi criado, no Rio de Janeiro, o Centro de Referência Professor Hélio Fraga, que ainda hoje é o mais importante centro de referência para o controle da tuberculose nas áreas de diagnóstico, ensino especializado e pesquisa científica e epidemiológica para os demais centros do país. Hoje, a tuberculose é uma doença totalmente curável, que só leva o paciente à morte se não for tratada com seriedade. Entretanto, com a emergência da Sida, na década de 1980, mudaram as características da doença, agravando a situação epidemiológica, constituindo um dos principais fatores para a deterioração do quadro da doença em países com alta taxa das duas infecções, como o Brasil.

4

Na década de 90, observaram-se também o aumento de casos de TB em várias do Brasil, principalmente, regiões urbanas com um aumento

concomitante da infecção pelo vírus da AIDS na população geral. E para piorar esse quadro, observaram-se taxas elevadas de TB resistente aos medicamentos usuais, em pacientes com tuberculose atendidos em hospitais gerais, frequentemente associada à SIDA. Os fatores socioeconômicos interferem também no acesso aos serviços de saúde, levando as pessoas mais vulneráveis a terem mais dificuldade no acesso, o que por sua vez contribui para o retardo do diagnóstico e tratamento da TB, aumentando as possibilidades de abandono do tratamento; um dos principais obstáculos para o controle dessa doença⁵.

A doença tem relação direta com a miséria e a exclusão social. Portanto as pessoas mais vulneráveis socialmente têm maior chance de desenvolvimento e proliferação desta doença. Em 2013, foi publicada uma revisão sistemática, correlacionando a tuberculose com fatores socioeconômicos⁶.

1.2-Epidemiologia

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo *M. tuberculosis*. O complexo *Mycobacterium* é um agente etiológico e certo micobactérias também podem induzir a um quadro clínico semelhante à tuberculose, sendo necessário o diagnóstico diferencial de culturas.^{7,8}

No final da década de 90, no Brasil, o diagnóstico dos casos novos de TB tenha condição de ser procedido ambulatorialmente. Entretanto, em grandes metrópoles, isso não ocorreu. No Rio de Janeiro no período de 1998 a 2004, 28 a 33% desses foram notificados em hospitais, enquanto que em São Paulo, em 2005, 42% em pronto-socorro ou hospitais, e se forem considerado pacientes HIV positivos, 52 % em pronto-socorros ou hospitais⁹. A ausência da busca ativa de casos, nas Emergências, aumenta o risco de transmissão da TB, em nível intra-hospitalar, devido ao retardo no diagnóstico e no início do tratamento adequado. Além disso, em nosso meio, mesmo com a disponibilização de tratamento antirretroviral de elevada eficácia, para os pacientes HIV positivos, a grande maioria dos casos de óbitos associados à TB e/ou TB/HIV, ocorre em hospitais de grandes metrópoles e locais sem ações coordenadas de controle de TB e TB/HIV⁹.

Atualmente, um terço da população mundial é portadora do bacilo da tuberculose. A nível mundial, em 2012, registaram 8,6 milhões de novos casos, e cerca de 1,3 milhões de pessoas morreram devido à doença, sendo que 95% delas vivem em países em desenvolvimento. ¹⁰

Em 2014, foram diagnosticados 530 000 novos casos em crianças abaixo dos 15 anos e 74 000 faleceram, calculando-se que existam 10 milhões de órfãos devido a tuberculose no Mundo.

Tuberculose continua como sempre foi, desde os primórdios da humanidade, a ser uma doença social; e um grave, e sempre atual, problema de Saúde Pública¹⁰.

1.3-Transmissão

A principal via de transmissão da tuberculose é a via aérea. Cada episódio de tosse, num doente com tuberculose pulmonar ou laríngea com baciloscopia positiva, origina cerca de 3.500 gotículas de aerossóis, que são invisíveis a olho nu, contendo bacilos da TB (bacilos de Koch ou BK). As gotículas de maiores dimensões caem no solo, ou, se inaladas, ficam depositadas nas vias aéreas superiores, enquanto os bacilos mais leves ficam suspensos no ar, durante várias horas, e são inalados por outras pessoas. São essas os responsáveis pela transmissão da infecção tuberculosa, sobretudo nas salas ou ambientes com pouca ou nenhuma ventilação. Cada doente com TB pulmonar/laríngea BK+ transmite a infecção a 10-12 pessoas por ano. Destas 10% (HIV-) e 50% (HIV+) desenvolve a TB doença. Doentes com TB pulmonar com BK negativo transmitem também a TB, mas apenas a 1-2 pessoas por ano. ¹¹

O principal hospedeiro o homem, e a fonte de infecção mais eficiente é a pessoa com tuberculose pulmonar ativa, pois elimina grande quantidade de bacilos. ¹²

A maioria dos infectados resiste ao adoecimento após a infecção, e desenvolve imunidade parcial à doença¹³. Nesses casos, os bacilos ficam encapsulados, em estado latente, em pequenos focos, que não progridem nem provocam o adoecimento^{12, 13}.

Essas pessoas tornam-se portadoras de infecção latente da tuberculose (ILTb). ^{12,13}

A eclosão de uma doença depende da estruturação de fatores contribuintes¹⁴ e a tuberculose é um excelente exemplo da multifatorial das doenças. A probabilidade de o portador de ILTB desenvolver a doença depende de múltiplos fatores relacionados ao bacilo (virulência e patogenicidade), ao ambiente em que se deu o contato (proximidade e tempo de permanência em 28 dias no ambiente) e à competência imunológica da pessoa infectada.^{12.13}

1.3.1-Patogênese da tuberculose

A infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* ocorre quando uma determinada quantidade de bacilos do respectivo organismo é dispersa no ambiente por um doente, portador de TB ativa, entrando, assim, em contacto com os alvéolos pulmonares de um novo hospedeiro. É nos alvéolos pulmonares que o organismo será rapidamente fagocitado por macrófagos alveolares, que na maioria dos casos, neutralizarão as micobactérias invasoras, através da resposta imunitária inata¹⁵.

Se os bacilos resistirem a esta primeira linha de defesa, irão iniciar a sua replicação ativa, em macrófagos; difundindo-se para células vizinhas, incluindo as do epitélio e do endotélio, crescendo exponencialmente, sendo atingida, em poucas semanas, uma elevada contagem bacteriana. Durante estes primeiros passos da infecção, o *Mycobacterium tuberculosis* pode difunde-se para outros órgãos através do sistema linfático, e por disseminação hematogênica, podendo, assim, afetar outras células. Em seguida, assim que a resposta adaptativa imune é desencadeada, ocorre migração de neutrófilos, linfócitos e outras células do sistema imunitário, para o local da infecção primária, dando, eventualmente, origem a um infiltrado celular, com a estrutura de um granuloma. O granuloma é revestido por componentes fibrosos, ocorrendo a sua calcificação, de modo que os bacilos permanecerão encapsulados no seu interior, e isolados pelo mecanismo de resposta imunitária do hospedeiro. A esta lesão primária foi conferida a designação de complexo de Ghon; nela, os bacilos persistem num estado de latência, metabolicamente inativos, durante anos, décadas, ou na maior parte dos casos, durante a totalidade da vida do hospedeiro. No entanto, durante a

infecção latente, por razões desconhecidas, os bacilos iniciam a replicação no interior dessa lesão primária, quando ocorrendo a ativação da doença.¹⁵

Com base nos avanços do conhecimento da biologia do *Mycobacterium tuberculosis*, bem como dos seus diversos estados metabólicos, da dinâmica da resposta imunitária e do espectro de condições observadas durante a infecção, foi proposto que, durante a infecção latente, a maioria dos bacilos permanece num estado inativo, enquanto a sua minoria encontra-se em estado de replicação ativa. Esses bacilos replicativos são processados e neutralizados pela defesa imunitária do hospedeiro e, conseqüentemente, são responsáveis pela indução de um grande número de células T de memória direcionadas, contra os antigênicos do *Mycobacterium tuberculosis*, que circulam no sangue periférico. Como tal, durante a infecção latente por TB, bactérias inativas repõem, constantemente, o volume de bacilos que se replicam ativamente e são rapidamente neutralizados pelo hospedeiro. Quando, por qualquer motivo, a resposta imunitária do hospedeiro não neutraliza esses bacilos, a replicação bacteriana descontrolada promove manifestações da doença, e a ativação da doença ocorre.^{14, 15}

1.3.2-Imunologia

Os conhecimentos da microbiologia e parasitologia, do século XIX, estreitaram o caminho às pesquisas científicas de agente infeccioso causadores de doenças. Após a descoberta do *Mycobacterium tuberculosis*, por Robert Kock, em 1882, começou-se a especular sobre a possível erradicação da doença. Hoje, a doença ainda persiste como grande problema de saúde¹⁶. A maioria das pessoas infectadas pelo bacilo de Kock, não desenvolve a doença; entretanto, a infecção pode persistir por anos, e a pessoa infectada pode acabar desenvolvendo a doença, uma vez que esse bacilo tem a capacidade de assumir parasitismo intracelular facultativo, e permanecer sob um estado de latência durante anos. Segundo estatísticas atuais, 85% dos casos ocorrem em adultos, e 15% em crianças.¹⁷

A maioria dos infectados resiste ao adoecimento, após a infecção, e desenvolve imunidade parcial à doença. Nesses casos, os bacilos ficam encapsulados, em estado latente, em pequenos focos que não progridem nem

provocam o adoecimento. Essas pessoas tornam-se portadoras de infecção latente da tuberculose (ILTB)^{12,13}

1.3.3-Co-infecção TB/HIV

Com o surgimento, em 1981, da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), observou-se, tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento, o aumento dos casos de tuberculose em pessoas infectadas pelo vírus HIV. A co-infecção TB/HIV constitui, atualmente, um sério problema de saúde pública em muitos países⁸. A tuberculose pulmonar era utilizada como indicador de desenvolvimento periférico; mas, hoje, com a disseminação da pandemia da Aids, tornou-se a terceira doença oportunista, mais frequente, em pacientes HIV positivos¹⁸.

A Aids está sendo um fator determinante nas mudanças epidemiológicas da tuberculose, modificando o caráter da doença, de uma evolução crônica para aguda, podendo levar os pacientes a óbitos em poucas semanas. A consequência mais alarmante da co-infecção é a capacidade do HIV tornar o paciente tuberculoso multidroga resistente; ou seja, sem tratamento quimioterápicos.³

Sabe-se que o esquema terapêutico utilizado mundialmente é capaz de curar cerca de 95% dos casos de tuberculose¹⁸; mas quando o indivíduo apresenta a coinfeção, as características clínicas; geralmente são incomuns ao paciente tuberculoso e podem causar dificuldades no diagnóstico, retardando o tratamento.¹⁹

Nesse sentido, a infecção pelo HIV/AIDS é o principal fator de risco para o adoecimento e morte por tuberculose.²⁰

Nessa população, o risco de adoecimento é de 20 a 37 vezes, maior do que na população geral.²¹

A cada quatro mortes, de pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA), uma está relacionada à TB.²²

1.4-Fisiopatologia

Além de macrófagos e células dendríticas, uma ampla gama de outros componentes imunes também está envolvida em uma resposta imune eficaz contra *Mycobacterium tuberculosis*, e incluem células $\alpha\beta$ -T (CD4 + e CD8 +), células T restritas CD1, células $\gamma\delta$ -T e as células T citotóxicas, bem como as citocinas produzidas por essas células imunes.^{23, 24}

As mais importantes, entre elas, são as células T CD4 + e o interferon de citocinas (IFN) γ . Os dois principais mecanismos de defesa dos macrófagos incluem a fusão dos fagossomas contendo *M. tuberculosis* com lisossomas (fagolisossoma), que é bactericida, e geração de óxido nítrico bem como outros intermediários reativos de nitrogênio (RNI), que exercem efeitos tóxicos sobre os bacilos.^{24, 25, 26}

A inibição das respostas de macrófagos a *M. tuberculosis* resulta em um subconjunto de macrófagos infectados que são incapazes de apresentar antígenos de MT em células T CD4 +. Isso resulta em insuficiente ativação de células T efetoras, levando à evasão de vigilância imunológica e à criação de nichos, onde *M. tuberculosis* sobrevive.^{24 25} Os bacilos dormentes podem habitar no granuloma durante a vida do hospedeiro, mas podem retomar seu crescimento se (ou quando) a resposta imune estiver comprometida (TB de reativação). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que um terço da população mundial estivesse infectada com *M. tuberculosis* e 5% a 10% dos indivíduos infectados desenvolverão doença de TB ativa durante o tempo de vida. No entanto, o risco de desenvolver doença ativa é de 5% -15% a cada ano, e o risco de vida são de 50%, em indivíduos co-infectados pelo HIV.^{24, 25, 26}

Vários fatores podem desencadear o desenvolvimento de doença ativa, da reativação de infecção remota, e tipicamente, envolvem o enfraquecimento do sistema imunológico. A infecção pelo HIV é o fator de risco mais importante na progressão para a doença ativa em adultos, pois provoca a depleção, das anormalidades funcionais das células T CD4 + e CD8 + que são fundamentais para a proteção contra a doença da TB ativa.^{24, 25, 26}

O modelo tradicional de LTBI, como descrito em detalhes acima, começa com a entrada de *M. tuberculosis* em células apresentadoras de antígenos, em alvéolos pulmonares, e o patógeno realiza a sobrevivência

intracelular, através de várias estratégias de evasão, incluindo a neutralização do pH fagosomal, a apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas que comprometem a estimulação das células T CD4 +, a apoptose dos macrófagos infectados e a interferência com a autofagia.^{24,25} A imunidade devido à exaustão ou à supressão das células T resulta na ressuscitação de *M. tuberculosis* de um estágio inativo a um estágio metabolicamente ativo que leva à doença ativa da tuberculose (reativação de TB).^{25,26}

1.5-Manifestações clínicas.

Na tuberculose pulmonar, os sintomas respiratórios são os mais importantes e orientadores.¹² Em adolescentes e adultos jovens, considera-se que o principal sintoma de tuberculose pulmonar seja a tosse por três semanas ou mais.^{13,20}

Também é comum febre baixa vespertina, sudorese noturna, anorexia e emagrecimento.^{13, 20.} Nos idosos e nas crianças, sinais e sintomas podem ser semelhantes aos quadros pneumônicos comuns.^{13, 20}

1.6-Exames laboratoriais

A grande dificuldade no diagnóstico da tuberculose reside no tempo necessário para a confirmação diagnóstica. Com o aumento da co-infecção tuberculose e HIV, depara-se com pacientes muito graves que precisam de instituição de terapêutica rápida e precisa. A associação do HIV e outras micobacterioses têm se tornado frequentes, devendo ser considerada no diagnóstico diferencial da tuberculose.^{20,23}

1.6.1-Pesquisa de bacilos ácido-álcool resistente (BAAR)

A coloração microscópica de BAAR é o método mais utilizado para o diagnóstico de tuberculose em todo o mundo. A coloração ácido-resistente é barata, rápida e tecnologicamente, pouco exigente, tornando-se uma técnica atraente para a identificação de infecções por micobactérias. A matriz cerosa glicolipídica da parede celular das micobactérias é resistente à descoloração por ácido-álcool após coloração com o corante carbol-fucsina, e bacilos vermelhos são visíveis após contra coloração.^{26, 27}

A principal limitação desse tipo de técnica reside no fato de que um número relativamente grande de bacilos deve estar presente para ser possível a sua observação microscópica. Os esfregaços revelam-se, geralmente, negativos, quando existem menos de 10 000 bacilos / ml de amostra, e muitos campos microscópicos precisam ser examinados para ser possível a identificação de bacilos, mesmo quando há 10 000 -50 000 bacilos/ml. Em locais onde a baciloscopia é o único teste feito para confirmar a tuberculose, muitos casos de tuberculose, com baciloscopia negativa, não é detectado. Este é um problema sério para os pacientes sem tuberculose cavitária, que tendem a ter menos bacilos na expectoração; incluindo muitos pacientes portadores de HIV com tuberculose infectada.^{26, 27}

A cultura, apesar da alta especificidade, demanda tempo para o resultado, tempo que, geralmente, não é disponível frente a casos graves, como os de imunodeficientes. A letalidade da tuberculose em indivíduos infectados pelo HIV pode ser 2,4 a 19 vezes maior do que nos indivíduos não infectados.^{28, 29} Por utilizar "primers" que são específicos para micobactérias, a PCR é capaz de, em poucas horas, definir sobre a presença ou não do patógeno na amostra, e indicar a melhor terapêutica para o caso. Em condições extremas, essa técnica pode ser refinada para torná-la capaz de determinar não só a presença, mas também, a sensibilidade de micobactérias aos tuberculostáticos disponíveis para o tratamento da tuberculose, além de estudos de epidemiologia molecular e tipagem de cepas em cultura.^{30, 31}

Conhecendo a complexidade das técnicas de biologia molecular, buscou-se padronizar uma reação que pudesse ser realizada de maneira simplificada, e que fosse facilmente reproduzida em laboratórios, com recursos mínimos para a realização do teste, e com mínimo risco biológico.^{32, 33}

Diferentemente dos outros ensaios de PCR em tempo real, o GeneXpert é uma técnica simples, que pode ser realizada com treinamento pessoal mínimo e fornece resultados em um curto período^{32,34,35,36}, - já que a única etapa manual é a preparação da mistura de um tampão bactericida com a amostra, e essa mistura é adicionada ao cartucho.^{37, 38,39}

Durante o tratamento, o paciente deve ser monitorado com testes convencionais, uma vez que a metodologia do GeneXpert não é indicada para o controle de tratamento, pois o teste detecta DNA de bacilos viáveis e não viáveis, sendo esse um dos pontos negativos do GeneXpert. ^{34,35,36,40,41}

O método apresenta boa sensibilidade e especificidade na identificação do bacilo, sendo uma ferramenta rápida para o diagnóstico de novos casos da doença. Em relação à resistência à RIF, poucos estudos avaliaram o desempenho do Genexpert. ^{41,43}

1.6.2-Princípio do teste do PCR.

O método GeneXpert MTB/RIF, ao mesmo tempo em que identifica o complexo MTB, a partir da sequência específica do gene *rpoB* na região 81 pares de bases, também verifica a resistência à rifampicina (RIF), por meio das mutações do gene. O ensaio GeneXpert é composto de um cartucho plástico, para o processamento das amostras líquidas, contendo tampões e reagentes liofilizados de PCR, uma máquina automática e um sistema de *software*, que analisa amostras respiratórias em 2 h. ^{41,42}

Denomina-se teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB). O teste de diagnóstico in vitro, semi-quantitativo, de nested PCR em tempo real, que foi concebido para:

- Detecção do DNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de expectoração ou em sedimentos preparados e em baciloscopia positivas ou negativas,
- Detecção de mutações do gene *rpoB*, associadas com resistência à rifampicina, em amostras de pacientes com risco de resistência à rifampicina. (Manual)

O teste MTB/RIF destina-se a ser utilizado com amostras de pacientes nunca tratados de tuberculose anteriormente e com suspeita clínica dessa doença. ^{40,42}

A utilização do Genexpert para detecção do MTB ou susceptibilidade à rifampicina não foi validada para pacientes que estão em tratamento para tuberculose.^{39,40}

Este sistema integra e automatiza o processamento das amostras à amplificação dos ácidos nucleicos, e detecção das sequências-alvo das amostras, utilizando ensaios de PCR e RT-PCR (transcriptase reversa-PCR) em tempo real. Possui 4 módulos que operam independentemente um do outro, oferecendo acesso aleatório a cada um.⁴⁰

O sistema requer a utilização de cartuchos Xpert MTB/RIF descartáveis (de utilização única), que contém todos os reagentes necessários para realização da PCR e dentro do qual ocorre o processo da reação. Como os cartuchos são autônomos, a contaminação cruzada entre amostras é eliminada.⁴⁰

1.6.3-Rifampicina

O mecanismo de ação deste antibiótico baseia-se no bloqueio da atividade da RNA-polimerase bacteriana, dependente do ADN, inibindo, assim, a síntese do mRNA e de novas cadeias protéicas. A resistência é determinada por uma das diversas mutações na cadeia de aminoácidos, que se encontra na região curta do gene *rpoB*, que codifica para a subunidade B da enzima polimerase.

A rifampicina é um derivado da rifamicina, introduzido em 1972, como agentes antituberculose. É um dos fármacos mais eficazes no tratamento da doença e, juntamente com a isoniazida, constitui a base de uma terapêutica múltipla para a tuberculose. O mecanismo de ação da rifampicina consiste na sua ligação à subunidade β da RNA polimerase, inibindo a elongação do RNA mensageiro. A maioria dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes rifampicina apresentam mutações no gene *rpoB*, que codifica para a subunidade β da RNA polimerase; como resultado, ocorrem mudanças que diminuem a afinidade para o fármaco resultando no desenvolvimento de resistência.^{43,44,45}

Em cerca de 96% dos isolados de resistentes à rifampicina, existem mutações na região denominada “*hot spot*” do gene *rpoB*. No entanto, apesar de menos frequentes, alguns estudos identificaram a existência de mutações fora da região “*hot spot*” do *rpoB*. Pode também ocorrer resistência cruzada com outros derivados da rifamicina. A mono-resistência à rifampicina é muito rara, podendo-se constatar que quase todas as estirpes resistentes à rifampicina apresentam também resistência a outros fármacos, especialmente à isoniazida. Esta é a razão pela qual a resistência à rifampicina é considerada um marcador indireto para a Tuberculose Multirresistente (TB-MR).^{43, 44, 46, 47,48}

Dos quatro mecanismos conhecidos pelos quais se dá resistência bacteriana (conjugação, transformação, transdução e mutação), o *M. tuberculosis* adquire resistência aos fármacos apenas por mutação. A resistência à isoniazida se deve à mutação mais frequentemente observada no gene *katG* e para resistência à rifampicina, no gene *rpoB*. Recentes estudos envolvendo técnicas de biologia molecular têm sido de grande relevância, tanto para a compreensão de mecanismos de transmissão e virulência do bacilo como para a abertura de novos caminhos para o diagnóstico e intervenções terapêuticas^{26, 44, 49, 50, 51, 52,53.}

2-JUSTIFICATIVA

A TB é a maior causa de morte entre as pessoas que vivem com HIV/AIDS, ocasionando pelo menos um entre quatro casos de morte.

Na terapia antituberculose, a taxa de mortalidade é mais alta nos primeiros três meses após o diagnóstico de TB, entre os pacientes com TB-HIV.

Para a identificação precoce dos casos de TB, um rápido e eficaz diagnóstico se faz necessário. Para isso, técnica específica, com alta sensibilidade e realizados em um curto período devem ser empregados. O GeneXpert MTB/RIF é o mais novo método preconizado pelo MS, sendo proposto para substituir a baciloscopia. Entre os pontos positivos do GeneXpert, está a identificação simultânea do DNA do complexo MTB e de mutações relacionadas à resistência à RIF, utilizando a técnica de PCR em

tempo real, integrados em um único cartucho descartável, que fornece essas duas análises dentro de 2 horas. A rápida identificação das linhagens resistentes pode contribuir efetivamente no tratamento e controle da TB.

Esse estudo visa analisar a resistência do MTB à rifampicina no GeneXpert, e avaliar se há necessidade introduzir outra droga no cartucho do teste de sensibilidade da prova do PCR, com isso visa diminuir a mortalidade dos pacientes co-infectados e iniciando imediatamente um tratamento de TB adequado e também evitar um aumento da resistência aos fármacos utilizados nos esquemas terapêuticos.

3-OBJETIVOS DO ESTUDO

3.1-Objetivo Geral

Aferir e estudar a eficácia do diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos através do PCR, clínico, baciloscopia e cultura.

3.2-Objetivos Específicos:

- Estimar a prevalência da *Mycobacterium tuberculosis* nas amostras de escarro.
- Estimar a concordância entre os métodos diagnósticos clínicos, baciloscopia e a cultura de escarro da *Mycobacterium tuberculosis* com o método diagnóstico genexpert.
- Estimar a prevalência de resistência à rifampicina.

4-MATERIAL E MÉTODOS:

A amostra de material biológico do estudo foi coletada de pacientes da coorte de HIV do ambulatório da CMB do HUGG, cuja idade está acima de 18 anos, no período entre de março de 2015 a março de 2016.

Nas amostras de material de escarro, processada na data de entrada no laboratório de Patologia Clínica e foi pesquisado o bacilo de Koch através da baciloscopia ^{27, 31, 32} e cultura ^{29, 26} e PCR ³⁰, sendo também procedido o teste de sensibilidade, o qual foi realizado a partir da cultura, o que requer

várias semanas adicionais para a obtenção de resultados³², PCR^{30 13, 17}, no laboratório de Patologia Clínica do HUGG.

Na baciloscopia, foi preparada a lâmina, conforme procedimento padronizado pelo Ministério da Saúde, e, após o preparo, foi efetuado a busca pelo *Mycobacterium tuberculosis*, através de que foi visualizado pelo microscópio óptico^{27, 32}.

No procedimento de PCR, o espécime clínico foi tratado com o reagente da amostra, que consta do kit MTB-RIF do (Gene-xpert), sendo inserida no cartucho, que também consta do kit MTB-RIF, e após esse procedimento o cartucho foi introduzida no aparelho de PCR (Gene-xpert) para a detecção de MTB.^{33, 13, 40,53}

Preparo das amostras pulmonares (escarro):

Processe de cada vez apenas as amostras suficientes para os módulos disponíveis para a execução do teste no sistema GeneXpert. As orientações de biossegurança sobre o manuseio de TB devem ser rigorosamente cumpridas.

Deve ser realizado o exame de cultura para micobactérias e teste de sensibilidade para as amostras pulmonares de acordo com as recomendações PNCT.⁴²

O controle de qualidade é realizado automaticamente em cada cartucho, ou seja, o controle está dentro do cartucho e é realizado para cada amostra processada no equipamento, dispensando o usuário de realizar controle como feitos rotineiramente em outras provas de PCR.^{40,42}

Cada teste inclui um controle de processamento da amostra (SPC) e um controle de verificação da sonda (PCR).^{40,42}

O controle de processamento da amostra assegura que a amostra foi corretamente processada. O SPC contém esporos não infecciosos sob a forma de um bolo de esporos secos que é incluído em cada cartucho para verificar o

processamento adequado do MTB. O SPC verifica se ocorreu à lise MT, se os organismos estiverem presentes, e verifica se o processamento da amostra foi adequado. Adicionalmente, esse controle detecta a inibição associada à amostra do ensaio de PCR em tempo real.^{40,42}

O controle de verificação da sonda (PCC) ocorre antes do início da reação de PCR, quando o sistema GeneXpert mede o sinal de fluorescência das sondas, para monitorar a reidratação das esferas, e enchimento do tubo de reação, a integridade da sonda e a estabilidade do corante. A verificação da sonda é aprovada, se preencher os parâmetros atribuídos originalmente.^{40,42}

Conteúdo do laudo:

1-*Mycobacterium tuberculosis*: não detectado

2- *Mycobacterium tuberculosis*: detectado

- Se MTB detectado:

a) Resistência à RIF detectada.

Foi detectada uma mutação no gene *rpoB* que esta dentro do valor delta de Ct válido.

b) Resistência à RIF não detectada.

Não foi detectada mutação no gene *rpoB*.⁴⁰

O comitê de Ética em Pesquisa do HUGG sendo aprovado em 31 de maio de 2016. Número do Parecer: 1.567.070

4.1-COLETA DOS DADOS:

Local e Período da coleta de dados

Para obtenção dos dados laboratoriais foi realizada uma pesquisa retrospectiva à base documental, no livro do registro da baciloscopia, cultura para MTB e da reação do PCR (GeneXpert) com a identificação e a sensibilidade à rifampicina do *Mycobacterium tuberculosis*, no Laboratório de Patologia Clínica.

Os dados foram coletados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle da UNIRIO, no período de março de 2015 a março de 2016.

Os dados sociodemográficas, clínicos foram obtidos dos prontuários dos pacientes do Serviço de Imunologia da 10^o Enfermaria do HUGG, no período de março de 2015 a março de 2016.

4.2-. Variáveis de interesse do estudo.

As variáveis de interesse sociodemográficas foram sexo, cor, idade na data do primeiro atendimento e categoria da via de transmissão foi a sexual ou sangue.

Variáveis clínicas de interesse são as presenças de febre (não/sim); Tosse persistente (não/sim); sudorese noturna (não/sim), emagrecimento (não/sim).

5-RESULTADOS:

No período de março de 2015 a março 2016, foram coletados dados das amostras de escarro de 85 pacientes portadores de HIV, com suspeita de BK, no livro de registro do Laboratório de Patologia Clínicas do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle da UNIRIO, para baciloscopia, cultura para MTB, e do GeneXpert, para identificação MTB e a sua sensibilidade à rifampicina.

Observamos, no teste de biologia molecular dos escarros dos 85 pacientes; que esses apresentaram 78% quanto à não identificação de

Mycobacterium tuberculosis, e somente em 22% encontra o microrganismo. A tabela 1 apresenta esses dados

Tabela 1-Frequência de MTB no GeneXpert nos pacientes portadores do HIV no HUGG entre março 2015 a março de 2016

	% válida
Negativo	78
Positivo	22
Total	100

Fonte: dados da pesquisa obtidos no Laboratório de Patologia Clínica do HUGG

A amostra para baciloscopia dos escarros desses pacientes, apresentou uma intensa negatividade (85%) e 15% somente apresentaram positividade para pesquisa de bacilo ácido-álcool resistente; o que não confirma a presença da MTB. A tabela 2 apresenta esses dados

Tabela 2-Frequência de BK na Baciloscopia nos 85 pacientes portadores do HIV no HUGG entre março de 2015 a março de 2016

	% válida
Negativo	85
Positivo	15
Total	100

Fonte: dados da pesquisa obtidos no Laboratório de Patologia Clínica do HUGG

Em apenas 66 dos pacientes foi realizada cultura para bacilo da tuberculose, 85% desses não apresentaram crescimento específico e somente em 10% houve crescimento de MTB. Foram excluídas 19 amostras, pois 11 tiveram contaminação, e em 8 não foi solicitado pelo médico assistente o exame para cultura. A tabela 3 apresenta esses dados.

Tabela 3-Frequência de MTB na cultura nos pacientes portadores do HIV no HUGG entre março de 2015 a março de 2016

	% válida
Negativo	72
Positivo	28
Total	100

Fonte: dados da pesquisa obtidos no Laboratório de Patologia Clínica do HUGG

Dentre as 19 amostras de escarro positiva na biologia molecular do GeneXpert, 100% dessas apresentaram susceptibilidade a rifampicina no teste de sensibilidade. Esses dados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4-Frequência do teste de sensibilidade do MTB à Rifampicina no GeneXpert nos pacientes portadores do HIV no HUGG entre março de 2015 a março de 2016

	% válida
Resistente à Rifampicina	0
Sensível à Rifampicina	100
Total	100

Fonte: dados da pesquisa obtidos no Laboratório de Patologia Clínica do HUGG

Com base nos resultados obtidos da análise dos dados dos prontuários médicos dos 85 pacientes; não foram observadas prevalências quanto à cor, todavia e 36% eram de cor desconhecida.(tabela 5)

Tabela 5 - Frequência da Cor nos 85 pacientes portadores do HIV no HUGG

	% válida
Branco	25
Negro	17
Pardo	22
Desconhecido	36
Total	100

Fonte: prontuários médicos do ambulatório da CMB do HUGG

Quanto ao gênero, 20% eram do sexo feminino e 80% do sexo masculino, a tabela 6 exibe esses dados.

Tabela 6 - Frequência do Sexo nos 85 pacientes portadores do HIV no HUGG

	% válida
Feminino	20
Masculino	80
Total	100

Fonte: prontuários médicos do ambulatório da CMB do HUGG

Quanto aos dados quanto à via de transmissão desses pacientes, nos prontuários médicos, conforme a tabela 7.

Tabela 7 - Frequência da via de Transmissão nos 85 pacientes portadores do HIV no HUGG

	% válida
Ausente da via Transmissão	100
Total	100

Fonte: prontuários médicos do ambulatório da CMB do HUGG

Quanto à sintomatologia, 8% apresentaram febre, 4% tosse e expectoração, 1% sudorese noturna e emagrecimento e para 82% não foram determinados sintomas clínicos em seus prontuários médicos. (tabela 8)

Tabela 8 - Frequência das sintomatologias nos 85 pacientes portadores do HIV no HUGG

	% válida
Febre	8
Tosse	4
Expectoração	4
Sudorese noturna	1
Emagrecimento	1
Ausentes	82
Total	100

Fonte: prontuários médicos do ambulatório da CMB do HUGG

Em relação à idade, os dados foram coletados nos pacientes maiores de 18 anos, não houve prevalência quanto à idade, segundo tabela 9.

Tabela 9 - Frequência das Idades nos 85 pacientes portadores do HIV no HUGG

Idade	Número de indivíduos
<20	8
21 – 50	63
> 51	14
Total	85

Fonte: prontuários médicos do ambulatório da CMB do HUGG

6- DISCUSSÃO:

O aumento da incidência mundial de cepas resistentes às drogas anti TB remete a imediata necessidade do desenvolvimento de ensaios que possibilitem a rápida detecção, pois o conhecimento do padrão de susceptibilidade ao tratamento a ser empregado, aumentando a possibilidade de cura além de limitar a propagação deste tipo de cepa na comunidade.⁵⁴

Os métodos laboratoriais mais utilizados na detecção de *M. tuberculosis* são os métodos bacteriológicos, que incluem a baciloscopia e a cultura.⁵⁵

Para a identificação precoce dos casos de TB, com rapidez e eficácia, se faz necessário, uma nova técnica encontra-se em fase de implantação, o teste molecular rápido denominado GeneXpert MTB/RIF, preconizado pelo MS, sendo proposto para substituir a baciloscopia. Nos estudos realizados por Iram et al.⁵⁶ e Tortoli et al.⁵⁷, foi constatado que esse método molecular atingiu melhores resultados, podendo substituí-la. Entretanto, Balcha et al.⁵⁸ e Weyer et al.⁵⁹ sugeriram que o GeneXpert seja utilizado de forma adjunta à baciloscopia. Encontramos alguns artigos apontando bom desempenho do método molecular no diagnóstico da TB, porém os valores de sensibilidade para detecção do bacilo variaram entre diversos autores.^{60, 61, 62, 63, 64}

No presente estudo em condições de rotina laboratorial, o GeneXpert MTB/RIF foi capaz detectar 22% de tuberculose, enquanto na baciloscopia tivemos 15% da presença de MTB no escarro. O que representou ganho de um acréscimo 7% no diagnóstico. Uma ampla variabilidade de proporção do ganho do diagnóstico foi observada em diversos estudos publicados comparando os dois métodos. Ngbonziza et al., em Ruanda, encontraram um acréscimo diagnóstico de 32,3%,⁶⁵ enquanto em Moçambique, Cowam et al, relataram uma proporção de 69% de ganho diagnóstico.⁶⁷ Em uma população HIV positiva, Auld et al.,⁶⁸ no Camboja, encontraram uma menor proporção de incremento diagnóstico com uso de GeneXpert MTB/RIF (26%). Avaliando dados de rotina de programa em diversos países, Ardizzoni et al.⁶⁶, observaram um ganho diagnóstico relativo médio do GeneXpert MTB/RIF, quando comparado à baciloscopia, de 42,3%. Entretanto, os autores ressaltaram a ampla variação na proporção de acréscimo diagnóstico entre diversos países, que variou de 9,7 a 110%.⁶⁶ Em nosso estudo ficaram abaixo da média, devem ser atribuídas a distintos cenários epidemiológicos entre os países avaliados e possíveis as metodologias empregadas.

A resistência MTB à rifampicina no presente estudo foi de 0,0%. No Brasil, em um ensaio clínico pragmático, Durovni et al.⁶⁹ encontraram 3,8% de resistência a rifampicina (3,3% entre casos novos e 7,5% em casos de retratamento). O GeneXpert MTB/RIF tem elevada especificidade na detecção de resistência à rifampicina (98%), já bem estabelecida em estudos prévios.⁷⁰ Trajman et al.⁷² mostraram o elevado valor preditivo positivo para resistência à rifampicina (90,2%), mesmo em países de uma relativa baixa prevalência para tuberculose resistente. Fornecendo resultados precisos, que permitem o início rápido do tratamento, enquanto são aguardados os resultados de cultura e TSA.⁷¹ Marlowe et al.⁷³, Scott et al.⁷⁴ e McAlister et al.⁷⁵ obtiveram resultados falso-positivos na detecção da resistência à RIF pelo método do GeneXpert, apontando as mutações silenciosas como causadoras desses resultados. Sohn et al.⁷⁶ e Zeka et al.⁷⁷ apontaram a necessidade de confirmar os resultados do GeneXpert com a cultura e TSA.

Portanto, no nosso estudo representa a real resistência a sensibilidade do MTB à rifampicina no nosso serviço, não havendo necessidade de introduzir no GeneXpert um outro fármaco para teste de sensibilidade.

Notamos em nosso estudo a prevalência da negatividade alta, nos exames solicitados para o diagnóstico de BK, como baciloscopia 85%, cultura 72% e do PCR 78%.

Para reduzirmos essa alta negatividade; solicitar esses exames, baseado na clínica sintomatológica do paciente. Pois sugerimos um protocolo de rápido preenchimento, de utilidade para o prontuário médico e auxiliar na orientação da rotina do laboratório de patologia clínica.

7-CONCLUSÃO

Como observamos na coleta de dados para estudo do projeto em pacientes portadores de HIV no HUGG, todos apresentaram 100% de especificidade na sensibilidade à Rifampicina. Donde se conclui que, nesta Unidade Hospitalar, não será necessário introdução de outro novo fármaco tuberculostático ao teste de sensibilidade no GeneXpert.

Isto conclui que seria necessário um estudo mais aprofundado em outros serviços preventivos e de tratamento de BK em pacientes portadores HIV nos diversos estados da União.

Notamos que a incidência no GeneXpert foi a prevalência com especificidade de 78% negativo para MTB, 22% de especificidade de positividade para MTB.

Podemos notar que a prevalência de sua negatividade foi alta em todos os exames solicitados para BK: baciloscopia 85%, na cultura para MTB foi de 67%.

Devemos melhorar a solicitação destes exames, baseado na clínica sintomatológica destes pacientes, pois nos prontuários médicos, e nas suas solicitações destes exames não apresentaram dados que sugerisse uma compatibilidade à presença de MTB.

Portanto sugerimos um protocolo para o prontuário médico, para um rápido preenchimento e o mesmo poderia ser usado para solicitação de exames para identificação para MTB, e auxiliando na orientação da rotina do laboratório de patologia.

Segue um modelo sugerido, podendo o mesmo ser modificado para melhor aceitação.

Anexo A**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFREÉ E GUINLE
BANCO DE DADOS DE PACIENTES COM TUBERCULOSE E HIV****INFORMAÇÕES SÓCIO-DEMOGRÁFICAS**

Nome do paciente:.....
 Registro:..... N° do SUS:
 Sexo:..... cor:..... data de nascimento:...../...../..... idade:.....
 Bairro de moradia..... CEP:..... Município:.....
 Escolaridade:..... Profissão:.....

INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS DE BK EM PACIENTES COM HIV

Data do início do acompanhamento:/...../.....
 Histórico familiar: S N I
 Tratamento prévio para tuberculose: S N I
 Portador HIV: S N Data do diagnóstico HIV : .../.../.....
 Transmissão sexual transmissão sangue e derivados
 Carga viral:..... data:...../...../..... CD 4:..... CD 8:..... Data:...../...../.....
 Em uso de ARV: S N I

INFORMAÇÕES CLÍNICAS

Apresentação clínica:
 Tuberculose pulmonar Tuberculose extra-pulmonar
 Febre °C Tosse dias Emagrecimento Sudorese noturna
 Expectorção Expec. Hemópticos Diagnóstico BK sem tratamento
 Abandono do tratamento História de BK

EXAMES COMPLEMENTARES

PPD resultado:.....mm
 Diagnóstico por imagem: radiografia Tomografia Ultra-sonografia

Material coletado para exame laboratorial: Data:...../...../.....
 Escarro espontâneo Escarro induzido Lavado brônquico-alveolar
 Punção pleural Biópsia Punção de gânglio Saliva
 Urina Abscesso Outro material:.....

Baciloscopia do escarro: N + ++ +++ Data:...../...../.....
 Baciloscopia de outro material:..... N + ++ +++
 Cultura do escarro: N P Data:...../...../.....
 Cultura de outro material: N P

GeneXpert (exame específico para M. tuberculosis)

Material examinado:..... Data:...../...../.....
 Resultado: ausente presente: baixa médio alta

Teste de sensibilidade ao fármaco no GeneXpert Data:...../...../.....
 Rifampicina sensível resistente

8-REFERÊNCIAS:

1-CONDE, MB; Souza GM, Kristcki AI. tuberculose sem medo. Ed. Atheneu – 1º ed. SP. 2002.

2-HIJJAR, M. A. Controle das doenças endêmicas no Brasil: tuberculose. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 27, p. 23-36, 1994.

3-LEITE, C. Q. F.; TELAROLLI JR., R. Aspectos epidemiológicos e clínicos da tuberculose. Revista de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v.18, n.1, p. 17-28, 1997.

4-BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Manual de bacteriologia da tuberculose. 2. ed. Rio de Janeiro, 1994. 115 p.

5-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. Ministério da Saúde: Brasília/DF, 2010.

6-SAN PEDRO, A; OLIVEIRA, RM. Tuberculose e indicadores socioeconômicos: revisão sistemática da literatura. *Rev Panam Salud Publica* 2013; 33(4): 294-301.

7-BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em: https://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio

8-BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Vigilância epidemiológica de doenças e agravos específicos: tuberculose. Rio de Janeiro, 1999.

Disponível em: <<http://www.fns.gov.br/pub/GVE/GVE0534A.htm>>. Acesso em: 20 set. 2000.

9-MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico - Perspectivas brasileiras para o fim da tuberculose como problema de saúde pública [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde - Volume 47(13), 2016.

[Citado 5Mar2017]. Disponível em:
<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/24/2016-009-Tuberculose-001.pdf>.

10-MALTEZ, FERNANDO; ALMEIDA, RAMALHO DE; ROSEIRA, MARIA DE BELÉM. "História de Doenças Infecciosas", Tipografia Artes Gráficas Ltda, 2014

11-Revista Pan-Amaz Saude 2017; 8(2): 67-78.

12-FARGA, V; CAMINERO, JA, 2011. Tuberculosis. 3ª ed. Santiago de Chile: Editorial Mediterráneo Ltda.

13-BRASIL (Brasil, 2016e). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

14-ROUQUAYROL, MZ; ALMEIDA-FILHO, N, 2003. Epidemiologia & Saúde. In: Epidemiologia, história natural e prevenção de doenças. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A. p. 26-28.

15-DELOGU, Giovanni; SALI, Michela; FADDA, Giovanni. The biology of *mycobacterium tuberculosis* infection. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 2013, 5.1. Disponível em:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3867229/>

16-FERREIRA, M. A. S.; FONSECA, L. S. Diagnóstico sorológico da tuberculose. Revista de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v.18, n.1, p. 41-56, 1997.

17-HAGGSTRÄM, F.M.; TONIETTO, V. Tuberculose: programa de educação continuada. Jornal da AMRIGS, Porto Alegre, set. 1998. Encarte

18-JOB, J. R. P. P., et al. Comparação de dados epidemiológicos da tuberculose pulmonar em Sorocaba, SP, Brasil, em uma década (1986-1996). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 596-597, 1998.

19-ZUMLA, A. et al. Impact of HIV infection on tuberculosis. *Postgrad Medicine Journal*. London, UK. v. 76, n. 895, p. 259-68, 2000. Disponível em: <<http://www.bireme.br>>. Acesso em: 17 ago. 2000.

20-BRASIL (Brasil, 2011a). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

21-SEISCENTO, M. Tuberculose em Situações Especiais: HIV, Diabetes Mellitus e Insuficiência Renal. *Pulmão RJ* 2012; 21(1):23-26. D

22-WORLD HEALTH ORGANIZATION: Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. *WHO/HTM/TB/2010.3* Geneva, Switzerland: WHO; 2010.

23-Doenças. SDESDdTCdn VECdCd. Mudanças no tratamento da tuberculose. *Ver. Saúde Pública* 2010; 44: 197-9

24-DUCATI, RG; RUFFINO, A. NETTO; BASSO, LA. Memória do Instituto. 2006

25-SANTOS, JS; BECK, ST. A coinfeção tuberculose e HIV: um importante desafio – Artigo de revisão. *RBAC*. 2009; 41(3): 209-215.

26-TIERNEY, LAWRENCE, J.; APADAKIS, MAXIME A.; MCPHEE, Stephen J. (ed.) Pulmonary Tuberculosis. eds. *Current Medical Diagnosis and Treatment, 2014*. McGraw-Hill/Appleton & Lange, 2014

27-LACEN-Tuberculose - Diagnostico Laboratorial – Baciloscopia. 2016 (Accessed 23/03/2016, at).

28-WHO. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. In: *Data WLC-i-P*, ed. 2009.

29-FAIR, E;HOPEWELL, PC, PAI, M. International Standards for Tuberculosis Care: revisiting the cornerstones of tuberculosis care and control. *Expert Review of Anti- infective Therapy* 2007; 5:61-5.

30-MOURE, R; MUNOZ, L; TORRES, M; SANTIN, M; MARTIN, R; ALCAIDE, F. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method. *J Clin Microbiol* 2011; 49(3): 1137-9.

31-SAN, PEDRO, A; OLIVEIRA, RM. Tuberculose e indicadores socioeconômicos: revisão sistemática da literatura. *Rev Panam Salud Publica* 2013; 33(4): 294-301.

32-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2012. Manual de Biossegurança para Laboratórios da Tuberculose. *WHO/HTM/TB/2012.11*,2016, at

33-BULA DO KIT Xpert MTB/RIF – GeneXpert . Package inserts.(Manual 2011)

34-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE 2011- Policy statement automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance; Xpert MTB/RIF system. WHO/HTM/TB/2011.4

35-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2014. Xpert MTB/RIF. Implementation. Manual Technical and Operacional "how to" practical considerations. WHO/HTM/TB/2014.

36-MINISTÉRIO DA SAÚDE; Secretaria de Vigilância em Saúde; Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde: Brasília/DF, 2010.

37-HUF, G; KRITSKI, A. Avaliação da utilidade clínica de novos testes diagnósticos em tuberculose: o papel dos ensaios clínicos pragmáticos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2012; 38: 237-45.

38-RACCHOW, A; ZUMLA, A; HEINRIICH, N; ROJAS-PONCE, G; MTAFYA, B; REIITHER, 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

39-BRATS Ano VI nº 16 | Setembro de 2011.

Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde

40-MANUAL DO USUÁRIO – GeneXpert -XPRT® MTB/RIF No diagnóstico da tuberculose pulmonar. 2011. at.

41-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):229-37.

42-MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. *Bol Epidemiol [Internet]*. 2014 [citado 2015 dez 27];44(2):1-13. Disponível em: <http://www.suvisa.ba.gov.br/sites/default/files/Boletim-Tuberculose-2014.pdf>

43-PALOMINO, Juan Carlos; MARTIN, Anandi. Drug Resistance Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. *Antibiotics*, 2014, 3.3: 317-340. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2079-6382/3/3/317/htm>

44-YANG, B., et al. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1998, 42.5: 621-628. Disponível em: <http://jac.oxfordjournals.org/content/42/5/621.full.pdf+html>

45-BRANDIS E HUGHES, 2013 BRANDIS, Gerrit; HUGHES, Diarmaid. Genetic characterization of compensatory evolution in strains carrying *rpoB* Ser531Leu, the rifampicin resistance mutation most frequently found in clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68.11: 2493-2497. Disponível em: <http://jac.oxfordjournals.org/content/68/11/2493.full.pdf+html>

46-CAVVUSSGLU, C; KARACA-DERICI, Y; BILGIC, A. In vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. *Clinical microbiology and infection*, 2004, 10.7: 662-665. Disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2004.00917.x/pdf>

47-TRAORE, HAMIDOU, et al. Detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as an initial indicator of multidrug resistance [Technical Note]. *The international journal of tuberculosis and lung disease*, 2000, 4.5: 481-484. Disponível em: http://docstore.ingenta.com/cgi-bin/ds_deliver/1/u/d/ISIS/80794423.1/uaatId/ijtId/2000/00000004/00000005/art00014/52C5FEE24B9C316D1423788225FBFD05BB863691CA.pdf?link=http://www.ingentaconnect.com/error/delivery&format=pdf

48-DE VOS, M., et al. Putative compensatory mutations in the *rpoC* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* are associated with ongoing transmission. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2013, 57.2: 827-832. Disponível em: <http://aac.asm.org/content/57/2/827.full.pdf+html>

49-MINISTÉRIO DA SAÚDE; Secretaria de Vigilância em Saúde; Departamento de Vigilância Epidemiológica; Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Nota Técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescente-versão 2. Ministério da Saúde.

50-FOUNDATION FOR INOVATIVE NEW DIAGNOSTIC (FIND), 2011. Frequently Asked Questions on Xpert MTB/RIF assay.

51-IOANNIS, P; PAAPVENTSIS, D; KARABELA, S; NIKOLAU, S; PANAGI, M; RAFTOPOULOU, E, et. al. Cepheid GeneXpert MTB/RF Assay for *Mycobacterium tuberculosis* Detection and Rifampim Resistance Identification in Patients with Substantiation in Patients with Substantial Clinical Indications of Tuberculosis and Smear-Negative Microscopy Results. J Clin Microbiol 2011; 49(8):3068-70

52-COLE, ST. *Mycobacterium tuberculosis*: drug resistance mechanisms. Trends Microbiol. 1994; 2(10): 411-5

53- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Rede Brasileira de Avaliação Tecnologia e Saúde. XPERT® MTB/RIF no diagnóstico da tuberculose pulmonar. BRATS [Internet]. 2011 set [citado 2015 dez 27];4(16):1-14. Disponível em: Disponível em: <http://rebrats.saude.gov.br/institucional/brats?download=92:n-16-xpert-mtb-rif-no-diagnostico-da-tuberculose-pulmonar> . [Links]

54-Garcia de Viedma D. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 349-359.

55-Takahashi, T., Tamura, M., Takasu, T. The PCR-Based Diagnosis of Central Nervous System Tuberculosis: Up to Date. Tuberc Res Treat. 2012, Article ID 831292, 17 pages (2012).

56-IRAM S, ZEENAT A, HUSSAIN S, YUSUF NW, ASLAM M. Rapid diagnosis of tuberculosis using Xpert MTB/RIF assay- Report from a developing country. Park J Med Sci. 2015 Jan- Feb; 31(1): 105-10. Doi: 10.12669/pjms.311.6970

57-TORTOLI E, RUSSO C,PIERSIMONI C, MAZZOLA E, DAL MONTE P, PASCARELLA M, et al, Clinical validation of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. Eur Respir J. 2012 Aug; 40(2): 442- 7. Doi: 10.1183/09031936.00176311

58-BALCHA TT, STUREGARD E, WINQVIST N, SKOGMAR S, REEPALU A, JEMAL ZH, et al. Intensified tuberculosis case-finding in HIV-positive adults managed at Ethiopian health centers: diagnosis yield of Xpert MTB/RIF compares with smear microscopy and liquid culture. PloS One. 2014 Jan;9(1): e85478. Doi: 10.1371/journal.pone.0085478

59-WEYER K, MIRZAYEV F, MIGLIORI GB, VAN GEMERT W, D'AMBROSIO L, ZIGNOL M, et al. Rapid molecular TB diagnosis: evidence, policy making and global implementation of Xpert MTB/RIF. *Eur Respir J*. 2013 Jul;42(1):252-71. Doi: 10.1183/09031936.00157212

60-CONDE MB, MELO FA, MARQUES AM, CARDOSO NC, PINHEIRO VG, DALCIN P de T, et al. III Brazilian Thoracic association Guidelines on tuberculosis. *J Brás Pneumol*. 2009;35(10): 1018-48

61-BARRETO LB, LOURENÇO MC, ROLLA VC, HUF G. Use of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test in respiratory samples from HIV-infected patients in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2014;40(2):148-54

62-DA SILVA ANTUNES R, PINTO M, TRAJMAN A. Patient cost for the diagnosis of tuberculosis in Brazil: comparison of Xpert MTB/RIF and smear microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014;18(5):547-51

63-PINTO M, TRAJMAN A, STEFFEN R, ENTRINGER AP. Cost analysis of nucleic acid amplification for diagnosing pulmonary tuberculosis, within the context of the Brazilian Unified Health Care System. *J Bras Pneumol*. 2015;41(6):536-8

64-BRASIL. Ministério da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde (homepage on the internet). Brasília: o Ministério; (cited 2016 Aug 22). Portaria MS no. 48 de 10 de setembro de 2013. Available from: www.bvsms.saudelegis/sctie/2013/prt0048_10_09_2013.html

65-NGABONZIZA JC, SSENGOOBA W, MUTUA F, TORREA G, DUSHINE A, GASANA M, et al. Diagnostic performance of smear microscopy and incremental yield of Xpert in detection of pulmonary tuberculosis in Rwanda. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):660. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-2009>

66-ARDIZZONI E, FAJARDO E, SARANCHUK P, CASENGHI M, PAGE AL, VARAINE F, et al. Implementing the Xpert MTB/RIF Diagnostic Test for Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Outcomes and Lessons Learned in 18 Countries *PLoS One*. 2015;10(12):e0144656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144656>

67-COWAN J, MICHEL C, MANHIÇA I, MONIVO C, SAIZE D, CRESWELL J, et al. Implementing rapid testing for tuberculosis in Mozambique.

Bull World Health Organ, 2015; 93(2):125-30.
<https://doi.org/10.2471/BLT.14.138560>

68-AULD SC, MOORE BK, KYLE RP, ENG B, NONG K, PEVZNER ES, et al. Mixed impact of Xpert MTB/RIF on tuberculosis diagnosis in Cambodia. Public Health Action. 2016;6(2):129-35. <https://doi.org/10.5588/pha.16.0001>

69-DUROVNI B, SARACENI V, VAN DEN HOF S, TRAJMAN A, CORDEIRO-SANTOS M, CAVALCANTE S, et al. Impacto 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001766>

70-BOEHME CC, NICOL MP, NABETA P, MICHAEL JS, GOTUZZO E, TAHIRTI R, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralized use the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. Lancet. 2011;377(9776): 1495-505. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60438-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60438-8)

71-STEINGARTKR, SCHILLER I, HOME DJ, PAI M, BOEHME CC, DENDUKURT N. Xpert MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. Cochrane Database Sys Rev. 2014,(1):CD009593. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD00993.pub3>

72-TRAJMAN A, DUROVNI B, SARACENI V, CORDEIRO-SANTOS M, COBELENS F, VAN DEN HOF S. High positive predictive value of Xpert in a low rifampicin resistance prevalence setting. Eur Respir J. 2014;44(6)1711-13. <https://doi.org/10.1183/09031936.00115514>

73-MARLOWE EM, NOVAK-WEEKLEY SM, CUMPIO J, SHARP SE, MOMENY MA, BABST A, et al. Evaluation of the cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. J Clin Microbiol. 2011 Apr;49(4):1621-3. Doi: 10.1128/JCM.02214-10

74-SCOTT LE, MACARTHY K, GOUS N, NDUNA M, VAN RIE A, SANNE I, et al. Comparison of Xpert MTB/RIF with other nucleic acid technologies for diagnosing pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting: a prospective study. PLoS Med. 2011 Jul;8(7):e1001061. Doi: 10.1371/journal.pmed.1001061

75-MACALISTER AJ, DRISCOLL J, METCHOCK B, DNA sequencing for confirmation of rifampin resistance detected by Cepheid Xpert MTB/RIF assay. *J Clin Microbiol.* 2015 May;53(5): 1752-3. Doi: 10.1128/JCM.03433-14

76-SOHN H, AERO AD, MENZIES D, BEHR M, SCHWARTZMAN K, ALVAREZ GC, et al. Xpert MTB/RIF testing in a low tuberculosis incidence, high-resource setting: limitations in accuracy and clinical impact. *Clin Infect Dis.* 2014 Apr; 58(7):970-6. Doi: 10.1093/cid/ciu022

77-ZEKA AN, TASBAKAN S, CAVUSOGLU C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnostic of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary e extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol.* 2011 Dec; 49(12):4138-41. Doi: 10.1128/JCM.05434-11