

Diagnóstico Microbiológico da Tuberculose

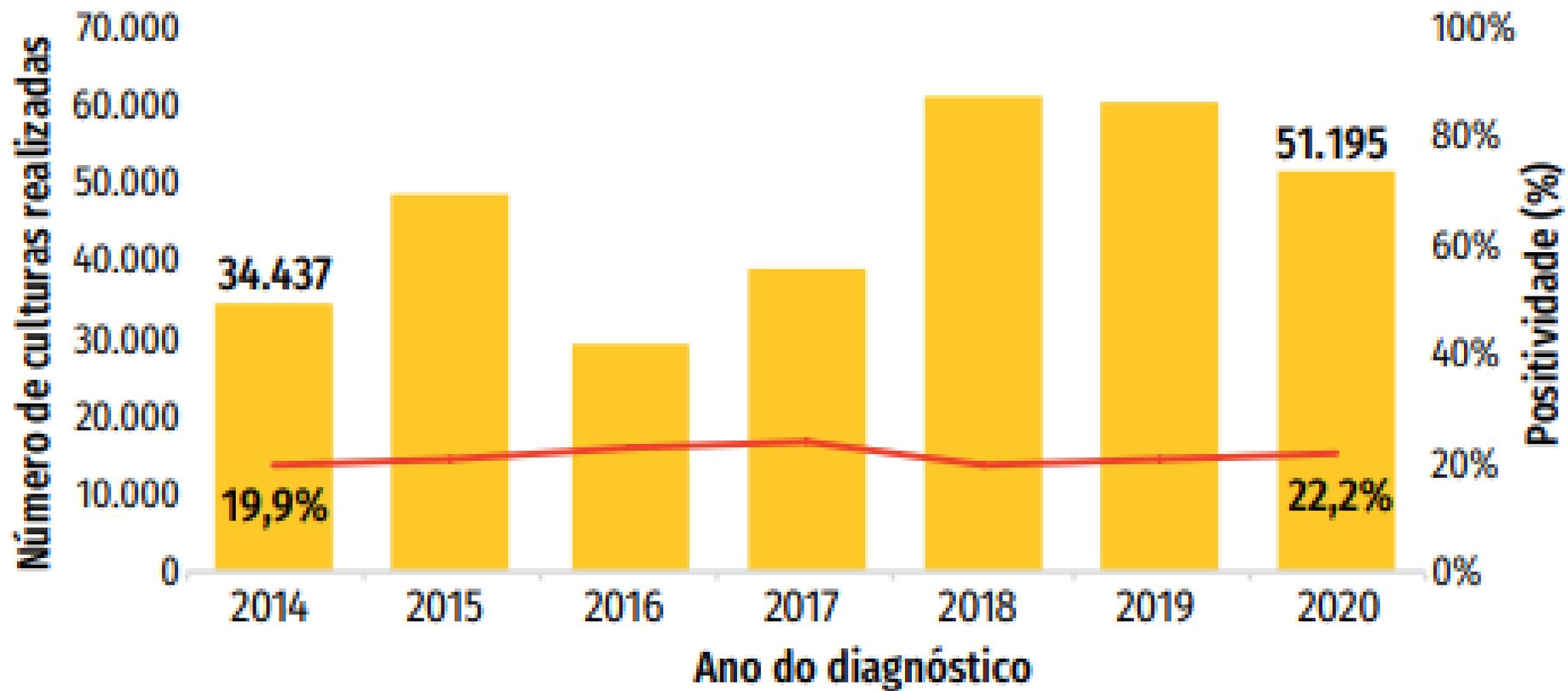
Profa. Silvana Spíndola de Miranda

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

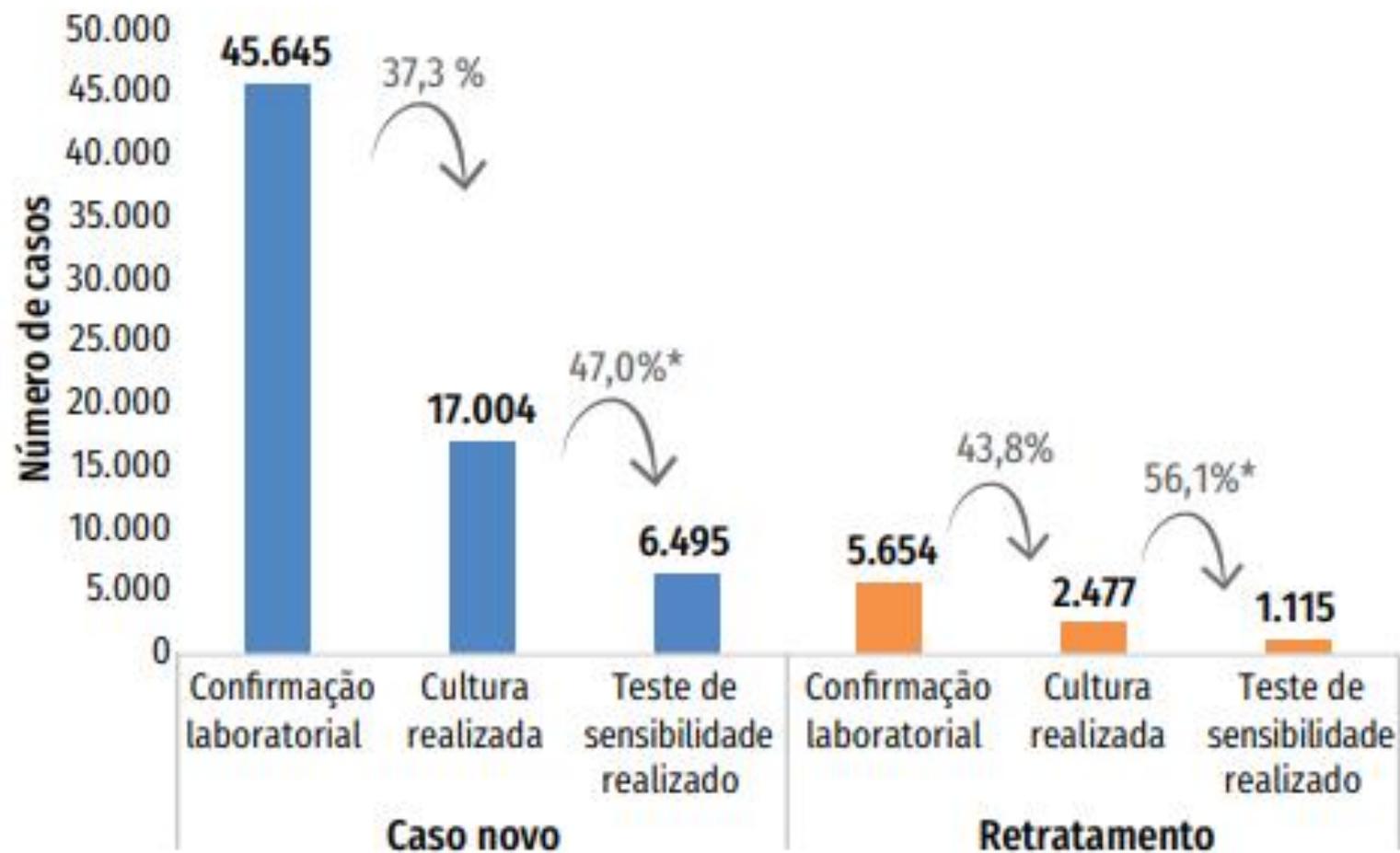
Coordenadora do Ambulatório de tuberculose do Hospital das Clínicas da UFMG

Coordenadora do Laboratório de Pesquisa em Micobactérias da FM/UFMG

Coordenadora da área de Diagnóstico da TB da REDE TB



Realização de cultura e teste de sensibilidade entre casos novos e retratamentos confirmados laboratorialmente, 2020^a





Morte por TB e por Covid-19

- ▶ Em 2020 a mortalidade foi similar da TB e COVID-19
 - ▶ 1.5 milhão de morte por TB (incluindo 214.000 entre pessoas que vivem com o HIV)
 - ▶ 1.8 milhão de morte por COVID-19
- ▶ O impacto da COVID-19 em relação ao acesso ao serviço de saúde resultou em atraso no diagnóstico da TB
 - ▶ OPAS, 2021; WHO 2021



Diagnóstico microbiológico

- ▶ Laboratório de Micobacteriologia
 - ▶ Detectar
 - ▶ Isolar
 - ▶ Identificar
 - ▶ Realizar teste de sensibilidade aos fármacos
- ▶ Utilizar meios de cultura líquidos e/ou sólidos que são considerados métodos padrão para o diagnóstico.

Baciloscopia - 5 a 10 mil bacilos/mL de amostra

➤ Métodos de coloração

➤ Ziehl-Neelsen

➤ Microscópio óptico

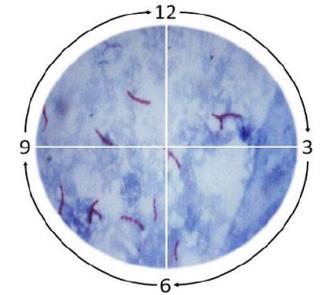
➤ Fluorescência – Auramina “O” – 10% de sensibilidade maior que ZN

➤ Microscópio de fluorescente – vapor de mercúrio – sala escura

➤ Microscópio LED (diodo emissor de Luz) – Não precisa de sala escura

➤ Automatizada ainda não recomendado pela OMS

Figura 18 – Campo microscópico



Fonte: CGLAB/Daevs/SVS/MS.



Cultura para micobactérias – 10 a 100 bacilos/mL de amostra viáveis

- Método padrão
- Meio sólido a base de ovo
 - LJ
 - Ogawa-Kudoh
- Meio sólido a base de ágar
 - Middlebrook 7H10 e 7H11
- Meio líquido
 - Middlebrook 7H9



Identificação das Micobactérias

- ▶ Testes fenotípicos
 - ▶ Análise microscópica
 - ▶ Análise macroscópica
 - ▶ Teste imunocromatográfico – anticorpo monoclonal anti-MPT64 (CMTB, exceto M.bovis-BCG)
 - ▶ Inibição de crescimento – PNB
 - ▶ Teste de Niacina, entre outros
- ▶ Testes genotípicos
 - ▶ PRA-hsp65
 - ▶ Métodos comerciais
- ▶ Espectrometria de massa
 - ▶ (MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) Maldi-Tof



Teste de sensibilidade aos fármacos

- ▶ Métodos fenotípicos
 - ▶ Meio sólido
 - ▶ LJ método de proporção
 - ▶ Nitratase
 - ▶ Kit SIRE Nitratase
 - ▶ Meio Líquido
 - ▶ MGIT – SIRE MGIT
 - ▶ MGIT - MIC



Kit SIRE NitrataSe® - Teste de sensibilidade aos fármacos de primeira linha

UFMG e Empresa brasileira PlastLabor®/Rio de Janeiro

- Teste de sensibilidade em amostras positivas e isolados clínicos
- Estreptomicina, Rifampicina, Isoniazida e Etambutol
- PNB incluso
- Controle de qualidade adequados *versus in house* (endossado, OMS 2009)
- Aprovado pelos órgãos de vigilância do Brasil (ANVISA)
- Substituição do LJ-método de proporção
 - Duas diluições *versus* várias diluições em LJ proporção
 - Custo baixo *versus* SIRE MGIT BACTEC™
 - Boa acurácia LJ proporção e SIRE MGIT BACTEC™

Resultados SIRE-PNB/NITRATASE PlastLabor®.

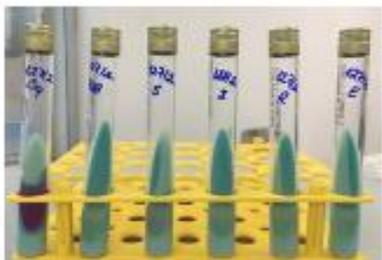


Figura 1: amostra sensível a todos fármacos



Figura 2: amostra resistente a S e sensível a I, R e E.



Figura 3: isolado MDR resistente (I e R) e sensível a S e E.

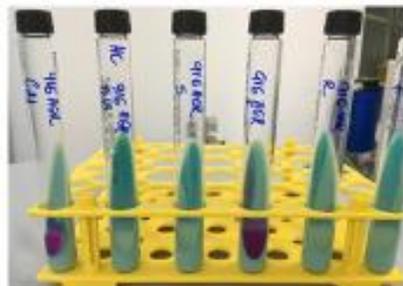


Figura 4: amostra resistente a I e sensível a S, R e E.



Article - Human and Animal Health

Detection of Drug Resistant Mycobacterium Tuberculosis Strains Using Kit SIRE Nitratase®: a Multicenter Study

Silvana Spindola de Miranda^{1*}
<https://orcid.org/0000-0001-7245-4472>

Isabela Neves de Almeida¹
<https://orcid.org/0000-0001-6152-7648>

Maria de Fátima Filardi Oliveira Mansur¹
<https://orcid.org/0000-0002-2414-0273>

Lida Jouca de Assis Figueredo¹
<https://orcid.org/0000-0001-5355-0784>

Wânia da Silva Carvalho²
<https://orcid.org/0000-0002-2575-6352>

João Paulo Amaral Hadaad³
<https://orcid.org/0000-0003-2823-6288>

Jaciara de Lourdes do Carmo Guimarães Diniz⁴
<https://orcid.org/0000-0001-6210-5658>

Andrea von Groll⁴
<https://orcid.org/0000-0002-6727-372X>

Pedro Almeida da Silva⁴
<https://orcid.org/0000-0003-1666-1295>

Maria Luiza Lopes⁵
<https://orcid.org/0000-0001-6894-1366>

Marcelo Cordeiro dos Santos⁶
<https://orcid.org/0000-0002-7140-7145>

Alexandra Brito⁶
<https://orcid.org/0000-0002-9036-702X>

Fernanda Carvalho de Queiroz Mello⁷
<https://orcid.org/0000-0003-3250-6738>

Thiago da Silva Santos Malaquias⁷
<https://orcid.org/0000-0001-8783-8962>

Julio Croda^{8,9}
<https://orcid.org/0000-0002-6665-6825>

Juliana Maira Watanabe Pinhata¹⁰
<https://orcid.org/0000-0001-5758-6688>

Rosângela Siqueira de Oliveira¹⁰
<https://orcid.org/0000-0002-5188-8367>

Erica Chimara¹⁰
<https://orcid.org/0000-0001-9574-8449>

Maria Lúcia Rossetti¹¹
<https://orcid.org/0000-0002-9672-9394>

Maria Laura Halon¹¹
<https://orcid.org/0000-0001-5866-0827>

Maria Cristina Lourenço¹²
<https://orcid.org/0000-0003-0382-9108>

Reginalda Ferreira de Melo Medeiros¹³
<https://orcid.org/0000-0001-9357-4932>

Fátima Cristina Onofre Fandinho Montes¹³
<https://orcid.org/0000-0003-3896-3526>

Diana Machado¹⁴
<https://orcid.org/0000-0002-6740-2632>

Miguel Viveiros¹⁴
<https://orcid.org/0000-0001-9676-6251>

Afrânio Lineu Kritski¹
<https://orcid.org/0000-0002-5900-6007>

¹Federal University of Minas Gerais, Faculty of Medicine, Mycobacteria Research Laboratory, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ²Federal University of Minas Gerais, Faculty of Pharmacy, Department of Social Pharmacy, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ³Federal University of Minas Gerais, Veterinary School, Department of Preventive Veterinary Medicine, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ⁴Federal University of Rio Grande, Faculty of Medicine, Laboratory of Mycobacteria, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil; ⁵Oswaldo Cruz Foundation, Evandro Chagas Institute, Ananideua, Pará, Brazil; ⁶Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil; ⁷Federal University of Rio de Janeiro, Institute of Chest Diseases, Clementino Fraga Filho University Hospital, Rio de

HIGHLIGHTS

- The Kit SIRE Nitratase® is the only commercial test using the Nitrate Reductase Assay
- It is a know-how transference from the public university to the national industry.
- It can be implanted in the health system in countries with high TB burden
- Highlighting the good accuracy, less time to results and less laborious.

Abstract: (1) Background: The Commercial Kit SIRE Nitratase® PlastLabor, is a drug susceptibility test kit used to detect *Mycobacterium tuberculosis* resistance to first-line TB treatment drugs. The present study aimed at evaluating its performance in a multicenter study. (2) Methods: To determine its accuracy, the proportion methods in Lowenstein Jensen medium or the BACTEC™MGIT™960 system was used as a gold standard. (3) Results: The study revealed that the respective accuracies of the kit with 190 *M. tuberculosis* clinical isolates, using the proportion methods in Lowenstein Jensen medium or BACTEC™MGIT™960 system as a gold standard, were 93.9% and 94.6%, 96.9% and 94.6%, 98.0% and 97.8%, and 98.0% and 98.9%, for streptomycin, isoniazid, rifampicin, and ethambutol, respectively. (4) Conclusion: Thus, the kit can rapidly screen resistance to streptomycin, isoniazid, rifampicin, and ethambutol. Additionally, it does not require sophisticated equipment; hence, it can be easily used in the laboratories of low and middle income countries.

Keywords: tuberculosis, MDR, nitrate reductase, technology

Table 1. Drug susceptibility testing using Kit SIRE Nitratase®; sensitivity, specificity, and accuracy using the Lowenstein Jensen medium as a standard (n = 98)

Drug	Drug susceptibility profile by NRA	Proportion Method using Lowenstein Jensen		Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
		Resistant	Susceptible			
Streptomycin ^a	Resistant	33	6	100	90.8	93.9
	Susceptible	0	59			
Isoniazid ^b	Resistant	41	3	100	94.7	96.9
	Susceptible	0	54			
Rifampicin ^c	Resistant	28	0	93.3	100	98
	Susceptible	2	68			
Ethambutol ^d	Resistant	17	0	89.5	100	98
	Susceptible	2	79			

Legend: a: Kappa = 0.87 (very good); b: Kappa = 0.94 (very good); c: Kappa = 0.95 (very good); d: Kappa = 0.93 (very good). Included sites: Pará/IEC, Manaus/FMT, IPEC/Fiocruz, IDT/UFRJ, and CDCT/RS.

Table 2. Drug susceptibility testing using Kit SIRE Nitratase®; sensitivity, specificity, and accuracy using the BACTEC™ MGIT™ 960 system as a standard (n = 92)

Drug	Drug susceptibility profile by NRA	BACTEC MGIT 960		Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
		Resistant	Susceptible			
Streptomycin ^a	Resistant	33	5	100	91.5	94.6
	Susceptible	0	54			
Isoniazid ^b	Resistant	38	0	88.4	100	94.6
	Susceptible	5	49			
Rifampicin ^c	Resistant	33	0	94.3	100	97.8
	Susceptible	2	57			
Ethambutol ^d	Resistant	25	1	100	98.5	98.9
	Susceptible	0	66			

Legend: *a*: Kappa = 0.89 (very good); *b*: Kappa = 0.89 (very good); *c*: Kappa = 0.95 (very good); *d*: Kappa = 0.97 (very good). Included sites: Adolfo Lutz/SP, CRPHF/Fiocruz, Dourados/UFGD, and IHMT/Lisboa.



- Métodos genotípicos

- Xpert MTB/RIF Ultra (TRM)

- Substitui a baciloscopia em Diagnostico casos novos
 - Detecção de gene de resistência a rifampicina
 - Não utilizado para controle de tratamento
 - Subsidiado
 - Sensibilidade e especificidade maior que a baciloscopia

- Hibridação de sonda em linha (LPA)

- Amostra positivas e culturas

- Genotype MDRplus – Genes de mutação da Rifampicina e Isoniazida
 - Genotype MDRsl – Gene de segunda linha

Critérios mínimos para incorporação de novos testes diagnósticos nos sistemas de saúde

ACURÁCIA (CARACTERÍSTICAS DO TESTE)

- ▶ Triagem
- ▶ **Sensibilidade** (acima de 90%)
- ▶ **Especificidade** (acima de 70%)

Diagnóstico

- **Sensibilidade** (acima de 80%)
- **Especificidade** (acima de 95%)

Cenário Atual - Novos testes diagnósticos para TB

Maioria – Estudos de validação/ Acurácia (sensibilidade e especificidade)

- Realizados em centros de pesquisa/estudos controlados
- **Resultados são utilizados pela OMS para recomendar**

Escassos – Estudos de efetividade sobre impacto epidemiológico e econômico na cascata diagnóstica e terapêutica realizados em condições de rotina, em diferentes regiões

Comentários Finais

► **Antes da incorporação de novas tecnologias para o diagnóstico de TB, os gestores devem promover estudos que avaliem o impacto epidemiológico e econômico, em condições de rotina, usando:**

► Indicadores propostos pela OMS em 2015:

- **aumento do acesso ao diagnóstico e** do uso da nova tecnologia
- **maior proporção de casos de TB notificados com confirmação bacteriológica**
- **menor proporção de óbito ou abandono no tratamento** de TB-DS e TB-DR
- **menor transmissão de TB na comunidade**

► **Assim será possível definir no sistema de saúde local:**

- **O real potencial clínico e econômico** da incorporação das inovações tecnológicas
- **A melhor alocação de recursos humanos e financeiros**
- **As melhores estratégias para aumentar a efetividade no uso de tais tecnologias**



Obrigada