

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicada à Saúde do Adulto**

Lida Jouca de Assis Figueredo

**Avaliação econômica de testes de diagnóstico da tuberculose e análise genômica do**  
***Mycobacterium tuberculosis***

Belo Horizonte  
2023

Lida Jouca de Assis Figueredo

**Avaliação econômica de testes de diagnóstico da tuberculose e análise genômica do**

***Mycobacterium tuberculosis***

**Versão final**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Aplicadas À Saúde do Adulto, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Aplicadas À Saúde do Adulto.

Orientadora: Silvana Spíndola de Miranda

Corientadora: Wânia da Silva Carvalho

Belo Horizonte

2023

F475a Figueredo, Lida Jouca de Assis.  
Avaliação econômica de testes de diagnóstico da tuberculose e análise genômica do Mycobacterium tuberculosis [recursos eletrônicos]. / Lida Jouca de Assis Figueredo. - - Belo Horizonte: 2022.  
88f.: il.  
Formato: PDF.  
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Silvana Spíndola de Miranda.  
Coorientador (a): Wânia da Silva Carvalho.  
Área de concentração: Ciências Aplicadas À Saúde do Adulto.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Tuberculose. 2. Diagnóstico. 3. Custos e Análise de Custo. 4. Medicina Genômica. 5. Dissertação Acadêmica. I. Miranda, Silvana Spíndola de. II. Carvalho, Wânia da Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WF 220

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

#### ATA DE DEFESA DE TESE

Às 08:30 horas do dia vinte e seis de outubro de dois mil e vinte e dois, sala 526, 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de LIDA JOUCA DE ASSIS FIGUEREDO, número de registro 2019657605, graduada no curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto. A presidência da sessão coube à professora Silvana Spindola de Miranda, Orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Silvana Spindola de Miranda - Orientadora (UFMG), Wania da Silva Carvalho - Coorientadora (UFMG), Cristiane Aparecida Menezes de Pádua (UFMG), Marcelo Antonio Pascoal Xavier (UFMG), Moises Palaci (UFES) - participação a distancia e Afranio Lineu Kritski (UFRJ) - participação a distancia. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada: AVALIAÇÃO ECONÔMICA DE TESTES DE DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE E ANÁLISE GENÔMICA DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar aprovada com correções a Tese de Doutorado, devendo ser feitas na mesma as seguintes modificações: acrescentar parágrafos na contextualização da tese e na discussão do artigo; descrever com mais detalhes a caracterização dos isolados/pacientes do artigo II; nas considerações iniciais melhorar a contextualização para fortalecer a discussão. A versão corrigida da Tese deverá ser entregue à Comissão Examinadora e coordenação do Programa, no prazo máximo de 90 (noventa) dias. Todas as modificações deverão ser discutidas e avaliadas pela Comissão Examinadora para aprovação final, que deverá atestar se as demandas foram ou não foram cumpridas, no prazo máximo de 30 (trinta) dias. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 26 de outubro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por Silvana Spindola de Miranda, Professora do Magistério Superior, em 04/11/2022, às 10:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Marcelo Antonio Pascoal Xavier, Professor do Magistério Superior, em 04/11/2022, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Wania da Silva Carvalho, Membro, em 07/11/2022, às 07:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Cristiane Aparecida Menezes de Padua, Professora do Magistério Superior, em 09/11/2022, às 21:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Afranio Lineu Kritski, Usuário Externo, em 18/11/2022, às 17:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Moises Palaci, Usuário Externo, em 02/12/2022, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 1838873 e o código CRC 93FB75BD.

Aos meus pais, Célia Assis e Célio Figueredo, e ao meu namorado Leandro Xavier por todo amor e apoio, hoje e sempre.

A Silvana e a Wânia por todo trabalho desenvolvido e pela amizade e companheirismo construído ao longo dessa trajetória.

Aos meus amigos, em especial minhas amigas, Amanda Alves, Thais Campos e Grazielle Menezes, que sempre me apoiaram e incentivaram a continuar na pesquisa e na carreira acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Silvana Spíndola de Miranda pelas oportunidades, aprendizados, apoio, amizade e por ter ajudado a me tornar uma profissional dedicada e qualificada. À Professora Wânia da Silva Carvalho por ser tão presente quanto uma orientadora, pelos ensinamentos, conselhos, conversas e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Micobacterioses, em especial à Isabela, Cláudio, Lucas, Danielle e Valéria pelo companheirismo, cooperação e amizade, e também do Laboratório de Pesquisa em Micobactérias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais pelo apoio, colaboração, paciência e carinho ao longo desses anos. Aos parceiros João Perdigão e Richard Salvato por toda parceria e conhecimento compartilhado, principalmente em bioinformática.

À coordenação e aos professores do centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial para os membros do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, pela troca de conhecimento, momentos compartilhados e o apoio na realização deste projeto.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, em especial à Andreia, por sua competência, eficiência, apoio, cuidado e atenção em relação à todas as demandas discentes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Fundação Mineira de Amparo à Pesquisa e Centro Nacional de Pesquisa pelo apoio financeiro a este projeto.

E por último, mas não menos especial, à todos os meus amigos que estiveram presentes, me motivando para realizar essa conquista, e que entenderam a minha ausência em alguns momentos.

## RESUMO I

**Introdução:** A detecção rápida e precisa da tuberculose é fundamental para melhorar o diagnóstico do paciente e diminuir a transmissão da doença. Os ensaios moleculares podem aumentar significativamente os custos do laboratório; portanto, o tempo médio e o impacto econômico devem ser avaliados antes de implementar uma nova tecnologia. O objetivo deste estudo foi avaliar o custo e o tempo médio da liberação do resultado da baciloscopia e do Xpert em um hospital universitário.

**Métodos:** O tempo de liberação e o custo do diagnóstico laboratorial da tuberculose foram calculados com base no custo médio e no custo baseado em atividades (ABC). **Resultados:** O tempo médio de resposta para a baciloscopia foi de 16,6 horas, enquanto para o Xpert foi de 24,1 horas. O Xpert teve um custo médio de US\$ 17,37 com um ABC de US\$ 10,86, enquanto a baciloscopia teve um custo médio de US\$ 13,31 com um ABC de US\$ 6,01. A sensibilidade da baciloscopia foi de 42,9% e sua especificidade de 99,1%, enquanto o Xpert teve sensibilidade de 100% e especificidade de 96,7%. **Conclusão:** O Xpert tem alta acurácia; no entanto, o tempo de resposta e o custo da baciloscopia foram menores do que os do Xpert.

Palavras-chaves: Diagnóstico. Tuberculose. Baciloscopia. Xpert.

## RESUMO II

**Introdução:** A tuberculose é a principal causa de morte entre as doenças infecciosas, e o conhecimento molecular do *Mycobacterium tuberculosis* permite a implementação de medidas mais eficazes para a vigilância e controle da doença. Atualmente, o sequenciamento do genoma completo (WGS) tem potencial para produzir dados epidemiológicos abrangentes. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade, agrupamentos genéticos e as mutações de *M. tuberculosis*.

**Métodos:** Estudo de análise genômica de 98 isolados do *M. tuberculosis* provenientes de Minas Gerais por meio do WGS. **Resultados:** A tipagem baseada em SNP classificou todos os isolados como linhagem 4, com alta proporção de sublinhagens LAM (73,5%), seguida da sublinhagem Haarlem (12,2%) e T (6,1%). Em relação aos agrupamentos, não foram identificados transmissão recentes. Já os isolados resistentes foram agrupados com maior proximidade (sublinhagem 4.3.4.1). As mutações que conferem resistência foram: 44/98 (44,9%) MDR-TB, 12/98 (12,2%) monoresistentes e 1/98 (1%) XDR-TB. Em 41/98 (41,9%) não foram encontradas mutações. **Conclusão:** A maioria dos isolados era LAM e TB-MDR. Os agrupamentos genéticos eram distantes e quando resistentes tinham maior proximidade.

Palavras-chaves: Tuberculose multidroga resistente. Sequenciamento do genoma completo. Mutações. Tipagem.

## **ABSTRACT I**

**Introduction:** Rapid and accurate tuberculosis detection is critical for improving patient diagnosis and decreasing tuberculosis transmission. Molecular assays can significantly increase laboratory costs; therefore, the average time and economic impact should be evaluated before implementing a new technology. The aim of this study was to evaluate the cost and average turnaround time of smear microscopy and Xpert assay at a university hospital. **Methods:** The turnaround time and cost of the laboratory diagnosis of tuberculosis were calculated based on the mean cost and activity based costing (ABC). **Results:** The average turnaround time for smear microscopy was 16.6 hours while that for Xpert was 24.1 hours. The Xpert had a mean cost of USD 17.37 with an ABC of USD 10.86, while smear microscopy had a mean cost of USD 13.31 with an ABC of USD 6.01. The sensitivity of smear microscopy was 42.9% and its specificity was 99.1%, while the Xpert assay had a sensitivity of 100% and a specificity of 96.7%. **Conclusions:** The Xpert assay has high accuracy; however, the turnaround time and cost of smear microscopy were lower than those of Xpert.

Key-words: Diagnostic. Tuberculosis. Bacilloscopy. Xpert.

## ABSTRACT II

**Introduction:** Tuberculosis is the main cause of death among infectious diseases, and the molecular knowledge of *Mycobacterium tuberculosis* allows the implementation of more effective measures for the surveillance and control of the disease. Currently, whole genome sequencing (WGS) has the potential to produce comprehensive epidemiological data. The aim of this study was to evaluate the diversity, genetic clusters and mutations of *M. tuberculosis*. **Methods:** Retrospective study of genomic analysis of 98 *M. tuberculosis* isolates from Minas Gerais through the WGS. **Results:** SNP-based typing classified all isolates as lineage 4, with a high proportion of LAM (73.5%) sublines, followed by Haarlem (12.2%) and T (6.1%) sublines. Regarding *clusters*, no recent transmissions were identified. Resistant isolates were grouped more closely together (sublineage 4.3.4.1). The mutations that confer resistance were: 44/98 (44.9%) MDR-TB, 12/98 (12.2%) monoresistant and 1/98 (1%) XDR-TB. In 41/98 (41.9%) no mutations were found. **Conclusion:** Most isolates were LAM and TB-MDR. Genetic clusters were distant and when resistant they were closer.

Key-words: Multidrug resistant tuberculosis. Whole genome sequencing. Mutations. Typing.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estimativa da incidência de casos de TB no mundo.....	19
<b>Figura 1.</b> Árvore geradora mínima as resistências com base nos SNP. ....	66
<b>Figura 2.</b> Árvore de distanciamento dos SNP dos 98 isolados .....	67

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Mutações associadas a RIF.....	68
<b>Gráfico 2.</b> Mutações associadas a INH .....	68
<b>Gráfico 3.</b> Mutações associadas a PZA.....	69
<b>Gráfico 4.</b> Mutações associadas a EMB.....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Divergência entre TSA e WGS .....	64
<b>Tabela 2.</b> Relação de cepas por linhagem e sublinhagem.....	64
<b>Tabela 3.</b> Mutações associadas aos fármacos segunda linha, injetável e fluoroquinolonas .....	69

## LISTA DE SIGLAS

ABC	Custo Baseado em Atividades
AMK	Amicacina
AU	Auramina
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
EMB	Etambutol
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDCT	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CI	Intervalo de confiança
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CTAB	Brometo Cetiltrimetilamônio
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
HC/UFMG	Hospital das Clínicas/UFMG
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
INDEL	Insertion–deletion mutations
INH	Isoniazida
KAN	Canamicina
LACEN-MG	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais

LAM	Latino-American Mediterranean
LBMSP/UFMG	Laboratório de Biologia Molecular e Saúde Pública/UFMG
LJ	Loweinstein-Jensen
	Laboratório de Pesquisa em Micobactérias da Faculdade de Medicina/Universidade Feder
LPM/FM/UFMG	Gerais
M.tb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR-TB	Tuberculose Multidroga Resistente
MIRU-VNTR	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number of Tandem Repeat</i>
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de Sódio
NALC	N-Acetyl L-Cisteína
NAOH	Hidróxido de Sódio
NGS	Next Generation Sequencing
NTM	Non Tuberculoous Micobacteria
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	ácido p-aminosalicílico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNB	Ácido Paranitrobenzóico
PZA	Pirazinamida
REDE-TB	Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose
RIF	Rifampicina
SDS	Sulfato Duodecil Sulfato

SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STR	Estreptomicina
TB	Tuberculose
TB-DR	Tuberculose droga resistente
TBE	Tris/Borato/EDTA
TB-RR	Tuberculose Resistente a Rifampicina
TCH	Ácido 2-tiofenocarboxílico
TE	Tampão de Eluição
TRM-TB	Teste Rápido Molecular para Tuberculose
TSA	Teste de Sensibilidade
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WGS	Whole Genome Sequencing
WHO	World Health Organization
XDR-TB	Tuberculose Extensivamente Resistente

## SUMÁRIO

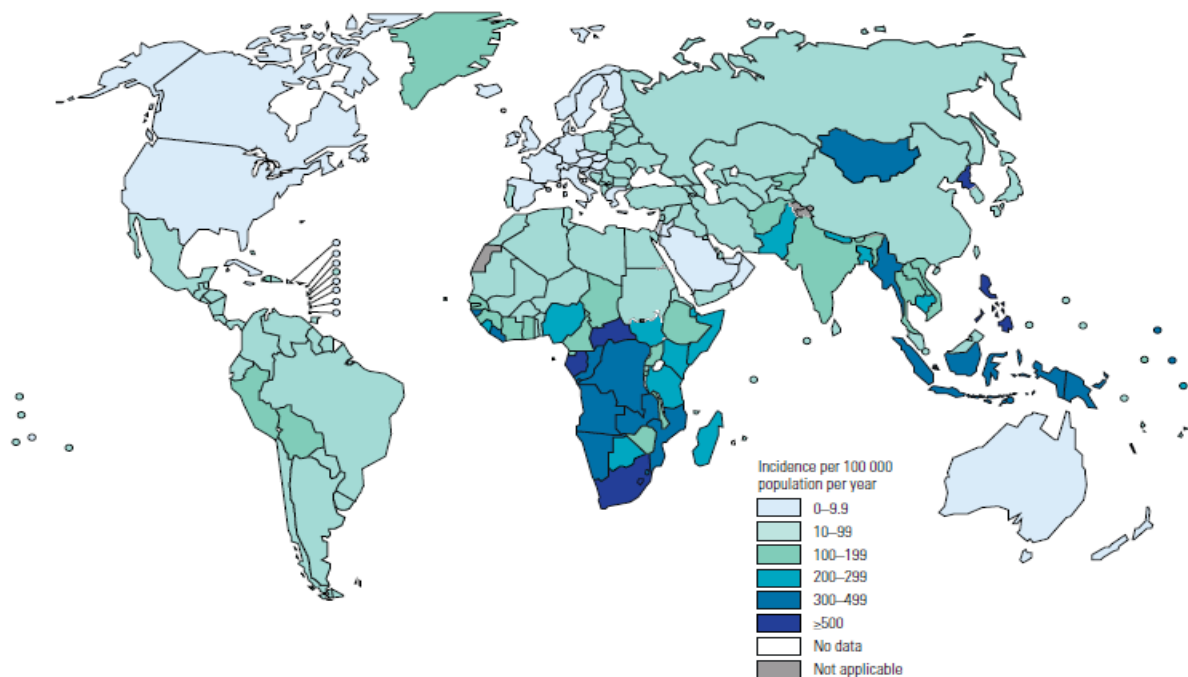
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	23
2.1. Técnicas bacteriológicas.....	23
2.2. Testes Genotípicos.....	23
2.3. Avaliação de custo de teste diagnóstico .....	24
2.4. Tipagem do <i>M. tuberculosis</i> .....	26
3. MATERIAIS E METODOLOGIA .....	28
3.1. Estudo do diagnóstico da tuberculose e avaliação econômica da baciloscopia e Xpert® .....	28
3.1.1. Delineamento.....	28
3.1.2. Rotina de funcionamento do LPM/FM/UFMG .....	28
3.1.3. Coleta de dados gerais do LPM/FM/UFMG .....	29
3.1.4. Coleta de dados para os componentes de custo.....	29
3.1.5. Itens avaliados por exame.....	30
3.1.6. Análise dos dados de custo.....	32
3.1.7. Tempo médio de liberação dos resultados.....	32
3.2. Estudo da análise genômica do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	33
3.2.1. Delineamento.....	33
3.2.2. Casuística e tamanho amostral .....	33
3.2.3. Critérios de Inclusão.....	33
3.2.4. Critérios de Exclusão.....	34
3.2.5. Isolamento Micobacteriano .....	34
3.2.6. Extração de DNA.....	34
3.2.7. Controle de qualidade do DNA e dosagem .....	35
3.2.8. Whole Genome Sequencing (WGS).....	36
3.2.9. Bioinformática e análise de dados .....	36
4. RESULTADOS .....	38
4.1. Artigo 1.....	38
4.2. Artigo 2 – A ser submetido na Revista BMC Genomics (A2) .....	57
5. CONCLUSÃO.....	84

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85
ANEXOS .....	90

## 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é a segunda causa de morte por um único agente infeccioso, a emergência da pandemia de covid-19 culminou na reorganização de ações, serviços e sistemas de saúde em todo o mundo, revertendo anos de progresso no controle da TB (WHO, 2022).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 10 milhões de pessoas desenvolveram TB em 2019, sendo predominante nas regiões do Sudeste Asiático (44%), da África (25%) e do Pacífico Ocidental (18%). As estimativas das taxas de incidência estão representadas na Figura 1. (WHO, 2020)



**Figura 1.** Estimativa da incidência de casos de TB no mundo.

Estima-se que, em 2020, a TB tenha acometido cerca de 9,9 milhões de pessoas no mundo, sendo responsável por 1,3 milhão de óbitos entre pessoas sem a infecção pelo HIV. Até 2019, a

doença era a primeira causa de óbito por um único agente infeccioso, tendo sido, desde 2020, ultrapassada pela Covid-19 (WHO, 2021)

O Brasil está entre os 30 países com mais alta carga da doença, e em 2019 a incidência de casos novos foi 46/100 mil habitantes, e o total dentre casos novos e casos de retratamento foi de 81.951,(WHO, 2020) No mesmo ano, o Brasil apresentou 4.490 óbitos em decorrência da doença, um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos/100 mil habitantes. (BRASIL, 2020)

Em 2019, em nível global 206.030 pessoas foram notificadas e detectadas com TB multidroga resistente (TB-MDR)/TB resistente a rifampicina (TB-RR). No Brasil a quantidade de casos notificados como TB-MDR/TB-RR foi de 721 casos, e desses 57% apresentaram sucesso no tratamento anti-TB.(WHO, 2020)

Em 2019, em Minas Gerais foram identificados 3.021 casos novos, e a forma pulmonar foi predominante em 83,8% dos casos. Desses, 77,6% tiveram confirmação laboratorial sendo 43,7% por meio do teste rápido molecular (Xpert) e apenas 31,7% realizaram cultura de escarro. Em número absolutos, a realização da cultura ocorreu em 175 amostras, das quais 127 testaram positivo, e somente 64 realizaram o teste de sensibilidade (TSA). A baixa realização de cultura e consequentemente de TSA é recorrente em todo o território nacional. (BRASIL, 2022)

Esses dados são preocupantes devido a não realização da cultura e consequentemente do TSA, pois sem o crescimento das colônias não é possível realizar o teste de sensibilidade impossibilitando a identificação da resistência do *M. tuberculosis* aos fármacos e, por conseguinte um tratamento inadequado e a persistências de cepas TB-MDR.

O diagnostico laboratorial de rotina da TB é baseado na microscopia das amostras clínicas, cultura e identificação fenotípica. Apesar de ser um método rápido, fácil e baixo custo, a

baciloscopia tem seu uso limitado pela baixa sensibilidade (45-80%). (Soares et al., 2020; Ryu, 2015)

A cultura ainda é reconhecida como “método padrão” devido a sua alta sensibilidade, além de permitir a identificação da espécie e a realização de testes de sensibilidade. (BRASIL, 2017). Dentre os métodos fenotípicos comumente utilizados para detectar TB-MDR está o teste de proporção, que avalia o crescimento da cultura em meio sólido contendo fármacos em concentração crítica, mas é um teste trabalhoso e que requer várias semanas até obter os resultados. (Lemus et al., 2004). Outro método é o sistema automatizado BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, EUA) que utiliza meio líquido e é um sistema que exige equipamentos, suporte técnico e o custo por teste varia entre \$20,10 - \$42,37. (Shah et al., 2013; WHO, 2016)

Em 2019, no Brasil realizou-se o diagnóstico laboratorial em 72,2% dos casos novos de TB e a proporção de cura entre os casos novos de TB pulmonar com confirmação laboratorial foi de 71,9%, enquanto nos casos pulmonares de retratamento de TB a proporção de cura foi de 51,9%, muito abaixo do observado para os casos novos e do recomendado pela OMS, que é de 80-85%. (BRASIL, 2020)

De acordo com as diretrizes da OMS, a detecção de TB-MDR/TB-RR requer confirmação bacteriológica de TB e de resistência aos fármacos por meio de testes moleculares rápidos, métodos fenotípicos ou tecnologias de sequenciamento. (WHO 2020)

Nos últimos anos houve progresso tanto na realização de testes para diagnóstico de TB-MDR e TB-RR. Globalmente 61% das pessoas com TB confirmada bacteriologicamente foram testadas para resistência à rifampicina, a cobertura foi de 59% para novos casos e 81% para casos tratados previamente. (WHO 2020)

## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1. Técnicas bacteriológicas**

Dentre as técnicas bacteriológicas de coloração conhecidos para a identificação de bacilos álcool-ácidos resistentes em secreções pulmonares, destacam-se o de Ziehl-Neelsen, introduzido em 1882 e que tem sido considerado o método de rotina universalmente aceito, e o método fluorescente preconizado por Hagemann desde 1937. Vários estudos comparam as duas técnicas, o método fluorescente revela um percentual maior de positividade (Bogen et al., 1941; Freiman e Mokotoff et al., 1943; Truant et al., 1962; Koch e Cote et al., 1965; Narain et al., 1971).

### **1.2. Testes Genotípicos**

Entretanto, os testes fenotípicos não têm sido usados na rotina na maioria dos laboratórios no Brasil. Assim, nos últimos anos, novos métodos estão sendo desenvolvidos para o diagnóstico rápido da TB, sendo as melhores alternativas as técnicas moleculares ou genotípicas. (BRASIL, 2017)

Dentre os métodos genotípicos mais utilizados, estão testes que detectam mutações que são conhecidas por estarem associadas à resistência fenotípica aos fármacos, tal como o Xpert MTB/RIF (Xpert) (Cepheid) e GenoType MTBDRplus (BioMérieux) (Lemus et al., 2004).

Em 2010, a OMS endossou o uso do Xpert em países com alta carga de TB. (WHO 2011) e em 2014, o Ministério da Saúde (MS) implementou este teste na rede SUS, denominando Teste Rápido Molecular (TRM), com o objetivo de substituir a baciloscopia e detectar a TB de forma mais rápida, com alta sensibilidade e especificidade para interromper a cadeia de transmissão. No ano de 2014, no qual foi incorporado na rede pública do Brasil o TRM GeneXpert MTB/RIF

observou-se o aumento na confirmação laboratorial dos casos no país, em decorrência da incorporação deste teste. (BRASIL 2020)

O MS recomenda que o Xpert seja realizado em amostras de pacientes em tratamento apenas para verificar se há resistência ao fármaco da rifampicina, não sendo recomendado a realização do teste para o acompanhamento da doença uma vez que o Xpert é capaz de identificar o material genético do bacilo e assim apresentar o resultado como detectado. (BRASIL 2018)

### **1.3. Avaliação de custo de teste diagnóstico**

Recentemente, tornou-se consenso que ao avaliar um teste diagnóstico é necessário considerar além da acurácia do teste e do tempo para liberação do resultado, os custos incorridos com os novos métodos diagnósticos para TB e TB-MDR, antes de sua incorporação no sistema de saúde. (D.W. Dowdy et al, 2018; Groessl et al., 2018; Pantoja et al., 2013)

Em países de alta carga, o custo total por teste do Xpert variou de US\$ 14.9 na Uganda, US\$ 13.7 a US\$ 32.1 em Nova Delhi e US\$ 12.69 a US\$ 13.22 na Ethiopia, sendo os cartuchos e os kits de reagentes os componentes de custo que mais influenciaram do custo total por unidade. (Ejalu et al., 2021; Sarin et al., 2019; Kaso et al., 2021.)

O custo é a base de uma avaliação econômica, pois reflete o funcionamento da economia na qual se insere a tecnologia, assim como expressa a estrutura organizacional de um determinado sistema de saúde. O cálculo dos custos apresenta desafios que englobam elementos mensuráveis, tanto qualitativos como quantitativos, aos quais podem ser atribuídos valores monetários. Deve considerar gastos com pessoal, material, estrutura física e aparelhos utilizados (Toma, 2017).

O diagnóstico laboratorial da tuberculose combina algoritmos com diferentes metodologias, diante ainda da organização complexa dos laboratórios, o custeio baseado em atividades, do inglês

activity-based costing model (ABC) constitui um método indicado para o cálculo de custos, permitindo identificar um custo padrão e realizar um inventário detalhado dos itens dele. (Almeida et al., 2017)

O ABC traz o conceito de que serviços ou produtos consomem atividade e as atividades consomem recursos para se produzir bens ou serviços. A avaliação dos custos de produtos, além dos custos diretos, é baseada no esforço de cada atividade do processo para produzir e entregar determinado serviço, identificando quais delas são mais dispendiosas. (Abbas *et al.*, 2016; Bonacim *et al.*, 2010)

O ABC é apropriado para organizações complexas, em que os produtos consomem recursos de maneira altamente heterogênea, como ocorre em hospitais gerais ou universitários. Outro custo a ser avaliado é o custo médio, que avalia o custo total em relação a quantidade de testes realizados durante um determinado período de tempo. (BRASIL, 2006)

As fórmulas utilizadas para construção da cadeia de cálculo dos custos estão exemplificadas abaixo.

$$\text{Custo médio} \\ \sum_{i=1}^{i=n} \frac{(p_i q_i d_i)}{A}$$

$$\text{Custo por atividade} \\ \sum_{i=1}^{i=n} P_i q_i c t$$

$P_i$  = valor dos recursos utilizados  
 $q_i$  = quantidade dos recursos utilizados  
 $d_i$  = dedicação média do recursos utilizado  
 $A$  = número total de atividades  
 $c$  = fator de conversão em tempo  
 $t$  = duração da atividade

Em um estudo realizado no Brasil que avaliou o custo médio e por atividade do Xpert MTB RIF demonstrou o valor de US\$ 11.53 e US\$ 9.89 para o custo médio e ABC, respectivamente. E o GenoType<sup>®</sup> MTBDR*plus* apresentou custo médio de US\$ 84.21 e US\$ 48.38 de custo ABC. (Soares et al. 2020) Em estudo realizado no Rio de Janeiro avaliou o custo médio do Xpert sem e com subsídio, sendo US\$ 175,24 e US\$ 33,48, respectivamente. (Silva et al. 2021)

#### **1.4. Tipagem do *M. tuberculosis***

A resistência de *M. tuberculosis* aos fármacos é uma grande ameaça para os programas de controle e tratamento da TB, devido a rápida disseminação dessas cepas resistentes e as dificuldades de se estabelecer esquemas terapêuticos efetivos. (Melo et al., 2003).

Uma importante demanda da saúde global é o estudo da genotipagem que permite a análise molecular e epidemiológica das linhagens genéticas das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) responsáveis pela disseminação da TB. (WHO, 2010)

Métodos clássicos de genotipagem, tal como *Spoligotyping* e *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number of Tandem Repeat* (MIRU-VNTR), foram amplamente utilizados para estudos de epidemiologia molecular (Gagneux, 2013), porém esses métodos analisam apenas uma fração do genoma. (Kamerbeek et al., 1997; Supply et al., 2006; Van Embden et al., 1993)

Em contrapartida, *Whole Genome Sequencing* (WGS) surgiu como a principal estratégia de tipagem para estudar tanto a evolução molecular de cepas circulantes, quanto a disseminação e a dinâmica de transmissão da TB sensível e resistente aos fármacos com base nos *Single Nucleotide*

*Polymorphism* (SNP) em todo o genoma, superando os métodos clássicos de tipagem (Meehan et al., 2019; Wyllie et al., 2018).

A fim de aperfeiçoar essa detecção, em 2018 a OMS preconizou o uso do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) para a detecção de mutações associadas à resistência de *M. tuberculosis*, pois essa técnica é uma ferramenta rápida, precisa e de alta confiabilidade, sendo crucial para a tomada de decisão sobre o tratamento para pacientes com TB-MDR e TB extensivamente resistente (TB-XDR). (WHO, 2018)

No Brasil, em 2020, a utilização de técnicas NGS foi reforçada pela Portaria Nº 1.949, de 4 de agosto de 2020 Programa Nacional de Genômica/MS, que dentre outros, objetiva compreender a interação entre genes e fatores ambientais influenciam na susceptibilidade de doenças e a utilização de informações genômicas para diagnóstico, prognóstico, monitoramento de fatores de risco e tratamento. Entretanto, não há dados nacionais do uso de NGS em TB.

O presente trabalho será dividido em dois estudos, no estudo I será abordado sobre o diagnóstico da tuberculose e avaliação econômica da baciloscopia e Xpert<sup>®</sup> e o estudo II a análise genômica do *Mycobacterium tuberculosis* no estado de Minas Gerais.

### **3. MATERIAIS E METODOLOGIA**

#### **3.1. Estudo do diagnóstico da tuberculose e avaliação econômica da baciloscopia e Xpert®**

##### **3.1.1. Delineamento**

As análises de custos foram realizadas utilizando os testes de diagnóstico feitos na rotina do LPM/FM/UFMG, foram coletados dados referentes aos componentes de custo das metodologias realizadas no laboratório realizados no período de novembro de 2014 a novembro de 2015.

##### **3.1.2. Rotina de funcionamento do LPM/FM/UFMG**

As amostras clínicas ao chegarem no laboratório foram descontaminadas pelo método N-Acetyl L-Cisteína (NALC) (WHO, 2009) para posterior realização da baciloscopia, Xpert e cultura. A baciloscopia foi realizada pelo método de fluorescência Auramina “O” (AU) em todas as amostras provenientes dos setores de pronto atendimento e enfermarias do Hospital das Clínicas da UFMG (HC/UFMG), bem como do complexo hospitalar.

A cultura foi realizada em meio sólido Loweinstein-Jensen (LJ), utilizando quatro tubos, sendo dois tubos sem fármacos, um contendo Ácido Paranitrobenzóico (PNB) e um contendo Ácido 2-tiofenocarboxílico (TCH). Os tubos com PNB e TCH foram utilizados para diferenciar as espécies do Complexo *M. tuberculosis* das demais espécies do gênero.

O Xpert, consiste num teste de diagnóstico *in vitro* automático que utiliza PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real para a detecção qualitativa do complexo *M. tuberculosis* e da resistência à rifampicina.

### **3.1.3. Coleta de dados gerais do LPM/FM/UFMG**

Para a construção da cadeia de custos foram coletados os seguintes dados em relação à infraestrutura e recursos humanos, sendo estes, os valores do contrato anual de manutenção do LPM/FM/UFMG, da conta mensal de luz, água e telefone do prédio, valores do contrato mensal da empresa terceirizada de segurança e de limpeza.

O consumo de energia, água e telefone, assim como a demanda referente aos serviços de limpeza e segurança é de 0,20% sob o valor total desses itens. Estes valores foram devidamente incorporados aos cálculos de custo em cada metodologia.

### **3.1.4. Coleta de dados para os componentes de custo**

Para a construção da cadeia de custos dos métodos avaliados foram coletados dados específicos de cada metodologia referentes aos valores de compra dos equipamentos, dos materiais de consumo permanente, dos insumos e salário dos recursos humanos. Para todos esses itens foram consideradas todas as etapas de realização de cada técnica incluindo as fases pré (registro e armazenamento das amostras recebidas) e pós-analítica (liberação de resultados e armazenamento de dados).

Para a realização dos cálculos de custo dos reagentes o valor total foi dividido considerando o volume de cada reagente utilizado, dos materiais unitários, pela quantidade utilizada para a realização de um teste. No caso dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI) foi considerado a quantidade de vezes que foi utilizado na rotina.

Foram coletados também para cada metodologia o número de exames realizados mensalmente, tempo médio para realização de um exame, número de técnicos, bioquímicos e

agentes administrativos envolvidos nas atividades e sua respectiva dedicação média por exame em relação a carga horária total de trabalho.

### 3.1.5. Itens avaliados por exame

- Baciloscopia centrifugada corada por Auramina
  - Equipamentos e materiais de consumo permanente: microscópio de fluorescência, centrífuga refrigerada, cabine de segurança biológica, cronômetro, bancada com água corrente, suporte para corar lâminas, frascos de vidro de 200mL, pinça anatômica, haste de metal, estante para tubos para secar lâminas, estante pra tubos de falcon, funil de vidro pra filtrar corantes, balcão, geladeira de armazenamento, agitador do tipo vórtex, no break, freezer, caixa porta lâmina, higienizador para mãos, cestas de lixo, telefone e computador.
  - Recursos Humanos: bioquímico, técnico de laboratório, agente administrativo, segurança e limpeza.
  - Insumos:
    - a) reagentes em litros: álcool à 70%, solução de auramina O, solução descorante de álcool ácido à 1%, solução de permanganato de potássio, solução NaOH (hidróxido de sódio) a 4%, solução neutralizante de NALC.
    - b) materiais em unidade: rolo de papel absorvente, lâminas de vidro, caixa de papelão para descarte de material, pipetas de pasteur, tubo de falcon de 50mL, saco plástico autoclavável, fita crepe, lápis, caneta esferográfica, fósforo, gaze.
    - c) equipamentos de proteção individual: máscara N95, avental descartável, luvas.

- Cultura em meio sólido de LJ
  - Equipamentos e materiais de consumo permanente: estufa bacteriológica à 37°C, centrífuga refrigerada, cabine de segurança biológica, cronômetro, frascos de vidro de 200ml para descarte de material, estante para tubos de ensaio, bandeja de polipropileno para incubação dos meios semeados, agitador do tipo vórtex, estante para tubos de falcon, balcão, pia, geladeira de armazenamento, no break, freezer, higienizador para mãos, cestas de lixo, telefone e computador.
  - Recursos Humanos: bioquímico, técnico de laboratório, agente administrativo, segurança e limpeza.
  - Insumos:
    - a) reagentes em litros: álcool à 70%, fenol à 5%, solução NaOH a 4%, solução neutralizante de NALC, meio sólido LJ, meio sólido LJ + PNB, meio sólido LJ + TCH.
    - b) materiais em unidade: rolo de papel absorvente, caixa de papelão para descarte de material, pipetas de pasteur, tubo de falcon de 50mL, saco plástico autoclavável, lápis, caneta esferográfica, gaze.
    - c) equipamentos de proteção individual: máscara N95, avental descartável, luvas.

#### Xpert

- Equipamentos e materiais de consumo permanente: cabine de segurança biológica, cronômetro, frascos de vidro de 200ml para descarte de material, agitador do tipo vórtex, estante para tubos de falcon, geladeira de armazenamento, no break, freezer, higienizador para mãos, cestas de lixo, telefone e computador.
- Recursos Humanos: Bioquímico, Agente Administrativo, Segurança e Limpeza.

- Insumos:

- a) cartucho Xpert, equipamento GXIV-4 Xpert MTB/RIF.
- b) materiais em unidade: rolo de papel absorvente, caixa de papelão para descarte de material, microtubos de 20 e 200  $\mu$ L, tubos para centrifuga de poliprolileno, ponteiros com filtro de 20, 200 e 1000 $\mu$ L.
- c) equipamentos de proteção individual: máscara N95, avental descartável, luvas.

### **3.1.6. Análise dos dados de custo**

A análise dos custos do diagnóstico laboratorial da TB por meio da baciloscopia e Xpert foram avaliados baseados em duas metodologias: custo médio e ABC. O Custo médio é calculado por meio do custo total dividido pela quantidade produzida em determinado período (BRASIL,2006) e nesse estudo foi considerando a quantidade de exames realizados por mês no LPM/FM/UFGM.

O ABC é calculado considerando uma atividade como o denominador para o cálculo do custo unitário da atividade, em vez da quantidade real consumida. Esse procedimento é utilizado com o objetivo de evitar flutuações no cálculo do custo unitário da atividade em função da variação da quantidade real processada. O princípio básico deste sistema é tornar direto o maior número possível de custos proporcionais e não-proporcionais, por meio de direcionadores de custos (Khoury *et al.*, 2000).

### **3.1.7. Tempo médio de liberação dos resultados**

Foi considerado desde a hora em que as amostras foram recebidas no setor de coleta até a hora em que os resultados dos testes foram divulgados no sistema. Neste período está incluso os tempos de recebimento das amostras, registro interno, o processo de

descontaminação/centrifugação das amostras, separação das alíquotas para cada teste diagnóstico, execução dos testes, liberação dos resultados pelo técnico até a liberação dos resultados no sistema do hospital.

Os testes realizados com urgência, com a amostra sendo processada de forma direta para baciloscopia não foram considerados, assim como esfregaços realizados no período noturno, aos finais de semana e feriados. Neste estudo foram considerados apenas os testes realizados rotineiramente com NALC/NaOH em horário comercial.

## **3.2. Estudo da análise genômica do *Mycobacterium tuberculosis***

### **3.2.1. Delineamento**

Estudo de análise genômica do *M. tuberculosis* provenientes de pacientes com TB atendidos em Minas Gerais, por meio do WGS.

Os pacientes eram provenientes de todo o Estado, distribuídos entre as cidades de Belo Horizonte, Poços de Caldas, Ipatinga, Itabira, Leopoldina, CarlosChagas, Recreio, Santa Luzia, Santa Bárbara, Betim, Marliéria, Uberada, Nova Serrada, Barbacena, Guazupé, São João Del Rei, Montes Claros, Itabirito, Itajubá, Manhumirim, Raul Soares, Contagem e Uba.

### **3.2.2. Casuística e tamanho amostral**

Amostra de conveniência com 98 isolados de *M. tuberculosis* no período de 2009 a 2017.

### **3.2.3. Critérios de Inclusão**

Cepas viáveis de *M. tuberculosis* estocadas a -80°C.

Cepas provenientes de amostras pulmonares.

### 3.2.4. Critérios de Exclusão

Cepas de Micobactérias Não Tuberculosas (MNT).

Cepas que não apresentaram cobertura média para a análise genômica de 20X.

### 3.2.5. Isolamento Micobacteriano

Os isolados foram previamente processados, identificados quanto à espécie de *M. tuberculosis* e testados quanto à sensibilidade aos fármacos de primeira linha para o tratamento da TB: Estreptomicina (STR), Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF) e Etambutol (EMB) por meio do método BACTEC<sup>®</sup> MGIT 960<sup>®</sup> com concentração crítica padrão.(Rüsch-Gerdes et al., 2006). Estes foram estocados no Laboratório de Pesquisa em Micobactérias/Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 54 isolados eram provenientes do Hospital Julia Kubitschek, Referência Terciária no tratamento da TB; 30 do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais (LACEN-MG) do Instituto Octavio Magalhães da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e 14 do Hospital de Alta Complexidade/Hospital das Clínicas/UFMG.

### 3.2.6. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de duas alçadas do crescimento micobacteriano do tubo de LJ e transferidos para um microtubo contendo 515 µL de tampão Tris-ácido Etilenodiaminotetracético (TE) e inativado a 80°C durante 30 minutos. Em seguida foi adicionado 64µL da solução de lisozima (10mg/mL) e incubado a 37°C por uma hora.

Após este procedimento foi adicionado 97µL da solução de SDS 10% (Sulfato Duodecil Sulfato) e de proteinase K, incubado a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 128µL de NaCl (Cloreto de Sódio) 5M com 128µL de Brometo Cetiltrimetilamônio (CTAB) previamente

aquecidos e homogeneizado no vórtex até obter uma mistura branca leitosa e incubar a 65°C por 10 minutos.

Posteriormente foram adicionados 1030µL de clorofórmio/álcool-isoamil (24:1), homogeneizado e centrifugado a 12.000 rpm a 4°C por 8 minutos. Aproximadamente 600µL da fase aquosa foram transferidos para um microtubo limpo e adicionou-se 0,6 do volume de isopropanol, misturado por inversão e incubado por 12 horas a -20°C. Após esse period overnight, foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos.

O sobrenadante foi descartado deixando 20 µL aproximadamente no pellet. Foi adicionado 1000µL de etanol 70% previamente resfriado e centrifugado as 12.000rpm por 5 minutos e depois o etanol 70% foi descartado. Após este procedimento os tubos foram centrifugados novamente por um minuto a 12.000 rpm e invertidos em papel absorvente.

Em seguida, foram colocados no concentrator a vácuo por 5 minutos a 65°C. Foram adicionados de 60-100 µL de tampão TE, de acordo com o tamanho o pellet visível. Após a adição do TE os DNA's foram armazenados por 24 horas na geladeira (2-8°C) e posteriormente armazenados a -20°C até o momento de uso.

### **3.2.7. Controle de qualidade do DNA e dosagem**

O DNA foi extraído no Laboratório de Biologia Molecular e Saúde Pública/UFMG (LBMSP/UFMG), e para verificar a integridade do mesmo foi preparado um gel de agarose a 1% (80 mL de Tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 1x + 0,8g agarose), adicionado 5 mL da DNA em cada canaleta e realizada corrida a 120 volts durante 45 minutos e verificado a presença de bandas sem degradação do DNA.

A dosagem foi feita por meio da absorvância no espectrofotômetro SpectraMax Plus utilizando-se 2  $\mu\text{L}$  de cada amostra, com concentração  $\geq 100\text{ng}/\mu\text{L}$  e razão  $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ .

### 3.2.8. Whole Genome Sequencing (WGS)

Aproximadamente 1 $\mu\text{g}$  de DNA foi fragmentado usando um sonicador Q800R2 (QSonica, Newtown, CT, EUA) com os seguintes parâmetros: sonicação de 3 min com pulso de 15 segundos ligado, 15 segundos desligado e 20% de amplitude. O DNA fragmentado foi selecionado por tamanho para atingir 600-650 bp por separação de fragmentos usando o Agencourt Esferas AMPure XP (Beckman Coulter, Código A63882).

A biblioteca de DNA foi preparada usando NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> II Kit de preparação para Illumina (New England BioLabs, Código E7645L). Adaptadores e oligos de índice de 8 bp adquiridos de IDT<sup>®</sup> (DNA integrado Technologies, San Diego, CA) com base em Kozarewa e Turner (2011), foram usados no lugar daqueles fornecidos no kit de preparação NEB em uma abordagem de indexação dupla (N.E. et al., 2016). Sequenciamento de extremidade pareada (2  $\times$  150 bp) foi pela Illumina NextSeq usando um kit de saída média ou alta saída 300 ciclos v2 (Illumina, Código FC- 404-2003 ou Código FC-404-2004) usando o procedimento padrão Illumina<sup>®</sup>. O sequenciamento foi realizado no Critical Path Institute - Estados Unidos.

### 3.2.9. Bioinformática e análise de dados

O controle de qualidade da leitura das *reads* foi realizado usando FastQC (v0.11.7) (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), em seguida as *reads* foram cortadas para remover as sequências de adaptadores e as de baixa qualidade usando *trimmomatic* (v0.33), sob os parâmetros: LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:36.(Bolger et al., 2014)

As *reads* filtradas foram então mapeadas com o genoma de referência *M. tuberculosis* H37Rv (número de acesso GenBank: NC\_000962.3) usando algoritmo implementado em BWA-MEM (v0.7.16). Posteriormente, o programa Samtools (v1.9) foi usado para converter do formato SAM para BAM e mapear as sequências (Li et al., 2009).

A cobertura e profundidade do mapeamento foi checado por meio dos arquivos BAM usando *Qualimap* (García-Alcalde et al., 2012) e *sambamba* (v0.6.8) foi usado para marcar e eliminar as *reads* duplicatas (Tarasov et al., 2015).

Para a identificação das variantes, SNP e pequenos INDEL como deleções e inserções foi usada as ferramentas *Samtools*. As variantes foram filtradas com base nos seguintes critérios: qualidade de mapeamento  $\geq 50$ , qualidade de alinhamento de base  $\geq 23$  e  $\leq 2.000$  leituras cobrindo cada site. Depois, filtramos o arquivo VCF bruto com profundidade de leitura mínima de 10X para definir uma variante. As variantes identificadas foram anotadas usando o programa *snpEff* (v4.3) (Cingolani et al., 2012).

As mutações associadas à resistência aos fármacos foram detectadas inicialmente usando pipeline *TB-Profiler* na versão de linha de comando (0.3.0) (Phelan et al., 2019), usando como entrada os arquivos BAM e configurações padrão. Quando necessário, as mutações foram verificadas nos arquivos BAM. As linhagens de *M. tuberculosis* foram definidas com base na tipagem de SNPs (Coll et al., 2014) usando código de barra de 62 SNPs realizado no *TB-profiler*.

A análise filogenética foi realizada usando pipeline *snippy* v3.1 (<https://github.com/tseemann/snippy>) para a variante e alinhamento de todos os genomas centrais. Posições SNP dentro de genes PE/PPE ou outras regiões repetitivas associadas com baixa capacidade de mapeamento pontuações foram removidas.

Uma árvore filogenética de máxima verossimilhança foi gerada utilizando o software RAxML (v8.10.12), (Stamatakis, 2014) aplicando o modelo generalizado de tempo reversível (GTR), e a árvore resultante foi enraizada usando *M. canettii* (Número de acesso do Genbank: NC\_019950.1).

Distâncias genômicas de pares foram obtidas pela ferramenta snp-dists (<https://github.com/tseemann/snp-dists>) e uma árvore geradora mínima usando Phyloviz Online (<http://online2.phyloviz.net/>). Um limiar de 5 SNPs foi usado para definir *clusters* genômicos (TM Walker, 2013) entre o alinhamento do genoma central.

A ferramenta TP Profiler foi utilizada para determinar as linhagens e sublinhagens e a árvore filogenética foi feita utilizando website iTOL com os dados obtidos de resistência e filogenia.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG sob o parecer CAAE: 95206318.3.0000.5149 e 06611912.8.0000.5149.

## **4. RESULTADOS**

Esta tese apresentará os resultados na forma de artigo conforme orientação da Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

### **4.1. Artigo 1**

Publicado no Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine (Qualis B3) em 25 de setembro de 2020.

**Cost analysis of smear microscopy and the Xpert assay for tuberculosis diagnosis: average turnaround time**

*Lida Jouca de Assis Figueredo*<sup>[1]</sup>, *Silvana Spíndola de Miranda*<sup>[2]</sup>, *Lucas Benício dos Santos*<sup>[1]</sup>, *Caroline Gontijo Gonçalves Manso*<sup>[1]</sup>, *Valéria Martins Soares*<sup>[3]</sup>, *Suely Alves*<sup>[4]</sup>, *Maria Cláudia Vater*<sup>[4]</sup>, *Afrânio Lineu Kritski*<sup>[4]</sup>, *Wânia da Silva Carvalho*<sup>[5]</sup>, *Cristiane Menezes de Pádua*<sup>[5]</sup> and *Isabela Neves de Almeida*<sup>[1]</sup>

[1] Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Pesquisa em Micobactérias, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[2] Universidade Federal de Minas Gerais, Grupo de Pesquisa em Micobacterioses, Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[3] Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Hospital Júlia Kubistchek, Laboratório de Microbiologia, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[4] Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa Acadêmico de Tuberculose, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[5] Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, MG, Brasil.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Rapid and accurate tuberculosis detection is critical for improving patient diagnosis and decreasing tuberculosis transmission. Molecular assays can significantly increase laboratory costs; therefore, the average time and economic impact should be evaluated before implementing a new technology. The aim of this study was to evaluate the cost and average turnaround time of smear microscopy and Xpert assay at a university hospital. **Methods:** The turnaround time and cost of the laboratory diagnosis of tuberculosis were calculated based on the mean cost and activity based costing (ABC). **Results:** The average turnaround time for smear microscopy was 16.6 hours

while that for Xpert was 24.1 hours. The Xpert had a mean cost of USD 17.37 with an ABC of USD 10.86, while smear microscopy had a mean cost of USD 13.31 with an ABC of USD 6.01. The sensitivity of smear microscopy was 42.9% and its specificity was 99.1%, while the Xpert assay had a sensitivity of 100% and a specificity of 96.7%. **Conclusions:** The Xpert assay has high accuracy; however, the turnaround time and cost of smear microscopy were lower than those of Xpert. Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular diagnostic. Pulmonary tuberculosis. Cost analysis. Health system.

## INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) has existed for millennia and remains a major global health problem<sup>1</sup>. The World Health Organization (WHO) estimated that in 2018, approximately 10 million people had developed TB, and that TB was responsible for an estimated 1.2 million deaths among human immunodeficiency virus (HIV) negative patients and an additional 251 thousand deaths among patients living with HIV<sup>1</sup>.

Brazil is one of 30 countries with a high TB burden, accounting for 84% of the global total number of cases<sup>1</sup>. In 2018, 78.652 new cases were registered, and only 34% of them were tested using the Xpert® MTB/RIF assay (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) (Xpert). Moreover, 79% of the new patients knew their HIV status, and 87% of the identified cases were pulmonary TB<sup>1</sup>.

TB typically affects the lungs, but can also spread to other sites<sup>1</sup>. The diagnosis of extrapulmonary TB remains a challenge, since the total number of bacteria in extrapulmonary specimens is often lower than that present in pulmonary specimens<sup>2</sup>. Furthermore, the collection

of extrapulmonary material requires invasive procedures, and it is usually difficult to obtain additional samples<sup>2</sup>.

Accurate, rapid detection of TB is critical for improving patient care and decreasing TB transmission<sup>1</sup>. The Xpert assay is an automated molecular test that can detect both TB and rifampicin resistance, generally within two hours after starting the test, with minimal hands-on technical time<sup>3</sup>.

The WHO issued initial recommendations concerning the Xpert test in early 2014. In a systematic review, its sensitivity in detecting TB in pulmonary samples ranged from 58% to 100%, whereas the specificity ranged from 86% to 100%<sup>3</sup>.

The authors highlighted that the Xpert test is expensive, and that further research is needed to evaluate its use in TB programs and to assess if this investment could help start treatment promptly and improve health outcomes<sup>3</sup>. Despite the WHO recommendations for the use of the Xpert system, sputum smear microscopy remains widely used in many countries for the rapid diagnosis of TB under routine conditions. This method has a variable sensitivity ranging from 32% to 89% and a specificity between 85% and 100%<sup>4,5</sup>.

TB control programs must balance costs with performance characteristics and the need for rapid results<sup>1,3,6</sup>. Intensive implementation of molecular assays may lead to significant increases in laboratory cost. Selective implementation of molecular assays could be considered for some settings<sup>6</sup>, and accurate and rapid detection of TB is critical for improving patient outcomes (increased cure and decreased mortality rates, additional drug resistance, treatment failure, and relapse) and decreasing TB transmission<sup>3</sup>.

Thus, the aim of this study was to evaluate and compare the costs and average time to completion of smear microscopy and Xpert assay at a teaching hospital.

## **METHODS**

### **Study design, variables and study site**

The present study assessed respiratory and non-respiratory specimens (n=1009) that had been received at the Research Laboratory in Mycobacteria of the School of Medicine of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), between November 2014 and November 2015. Of these, 141 patients accepted to participate, signed the term of free informed consent, and were included in the study of the accuracy and time of laboratory tests and in the analysis of clinical and sociodemographic characteristics.

Clinical and sociodemographic data were obtained using a standardized questionnaire and a review of the patients' records on their behavior (alcohol and tobacco use), HIV infection, and any abnormalities on pulmonary imaging (chest x-ray or computed tomography). A pattern suggestive of TB was the presence of cavitation, infiltrate in upper lobe and apical segment of the lower lobe or mediastinal enlargement, or increased hilar lymph node or miliary pattern or pleural effusion or confluent parenchymal opacities, characterized as a budding tree<sup>7</sup>.

These patients received medical care at the teaching hospital of the UFMG, a public and general university hospital that conducts educational, research, and medical care activities. This institution consists of one hospital unit and seven outpatient care centers<sup>8,9</sup>. Direct sputum smear examinations that were urgently requested were excluded from clinical specimens, since at the hospital, the Xpert system is not used immediately.

### **Processing of clinical samples**

The specimens were processed following the standard *N-acetyl-L-cysteine* and sodium hydroxide (NALC/NaOH) method with a final NaOH concentration of 1%<sup>10</sup>. After this step, the sediment was resuspended in 1.0 to 1.5 mL of sterile water and used for smear microscopy, Xpert testing, and culture tests.

*Smear microscopy:* All smears prepared from decontaminated samples were stained with auramine O and analyzed by fluorescence microscopy<sup>10</sup>.

*Xpert® MTB/RIF:* This assay was performed according to the manufacturer's instructions (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA). Briefly, a sample reagent was added in a 3:1 ratio to  $\geq 0.5$  mL of decontaminated specimen. The closed tube was agitated manually twice during a 15-min incubation at room temperature. Then, 2 mL of the inactivated sample reagent-sample mixture was transferred to the Xpert test cartridge. The cartridges were inserted into the Xpert device, and the automatically generated results were read after 90 min<sup>3,11</sup>.

#### **Average time: smear microscopy and Xpert**

To calculate the average time to the release of test results, we took into consideration the hour when the samples were received in the collection sector and the hour when test results were released in the system. This period includes the times of receipt of samples, internal registration, the process of decontamination/centrifugation of the samples, separation of the aliquots for each diagnostic test, execution of the tests, release of results by the technician, and release of the results into the computerized system of the hospital.

The times during which tests were performed urgently via direct smear, at night, on weekends and holidays were not considered; only those performed routinely with NALC/NaOH were considered.

### **Cost analysis**

The cost analysis of the TB laboratory diagnosis was based on the mean cost and activity based costing (ABC). The mean cost was calculated by dividing the total costs by the quantity produced over a determined period of time<sup>12</sup>, which considered the total number of examinations performed in a month. The ABC principle is suitable for complex organizations, such as hospitals, where products use consumer resources in a highly heterogeneous manner<sup>9,12</sup>, therefore covering as many direct and indirect costs as possible through cost drivers. The component cost evaluation and calculations were performed as described by Almeida et al. 2017 and the costs were expressed in USD, using the conversion rate of USD 1.00 = R\$ 4.03, as established by the Central Bank of Brazil in 2019 (<https://www.bcb.gov.br/>)<sup>9,13,14</sup>.

### **Statistical analysis**

Descriptive analysis was performed to characterize the study population concerning the selected variables. Measures of central tendency and dispersion were used for continuous variables, and absolute and relative frequencies for categorical variables.

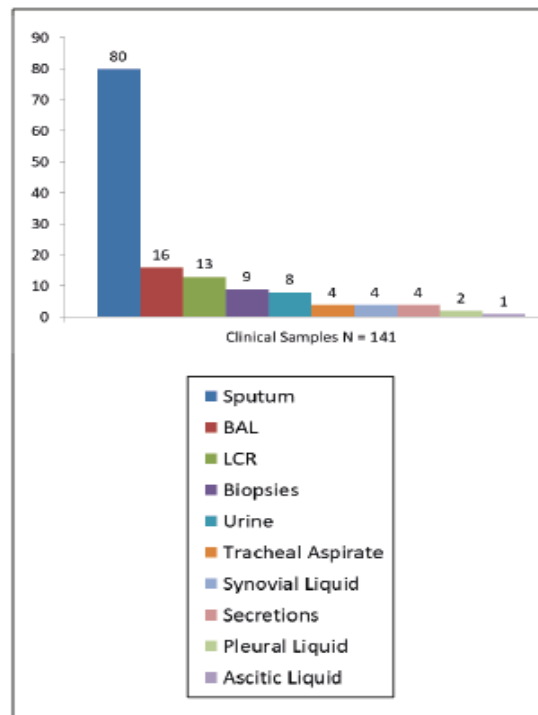
The sensitivity and specificity of *Xpert*® *MTB/RIF* and smear microscopy with their 95% confidence intervals (CIs) were estimated, comparing the results to those of the phenotypic identification test as a standard method<sup>10</sup>. All analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

### **Ethical considerations**

The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the UFMG (protocol numbers CAAE- 11821913.6.000.5257 and CAAE 0223.2412.7.1001.5149, and DEPE/HC protocol number 139/12).

## RESULTS

The study included 141 patients' clinical samples: 100 pulmonary specimens and 41 extrapulmonary specimens (Figure 1); 66% (93/141) of the patients were inpatients and 34% (48/141) were outpatients.



**Figure 1.** The distribution of clinical samples.

The sociodemographic characteristics of these patients are presented in Table 1. Most patients were male, aged 46 to 60 years (median=46.0), single, had non-white skin, had nine or fewer years of formal education, and 25 had pulmonary TB. Between 20% and 40% of the patients

were reported to be current users of alcohol and tobacco, respectively. Regarding radiological patterns, 27% presented presumed TB abnormalities.

**Table 1.** Distribution of sócio-demographic characteristics (n=141)\*

<b>Variables</b>	<b>N (%)</b>
<b><i>Socio-demographic</i></b>	
Age (years)	
18-35	39 (28.7)
36-45	27 (19.9)
46-60	37 (27.2)
61-88	33 (24.3)
Gender	
Male	83 (58.9)
Skin color	
Non-White	84 (80.0)
White	21 (20.0)
Education (years)	
Illiterate	5 (8.2)
≤ 9	39 (63.9)
≥10	17 (27.9)
Marital status	
Married	57 (48.3)
Single	61 (51.7)
<b><i>Behavioral</i></b>	
Alcohol use (CAGE)	
Positive	11 (40.7)
Negative	16 (59.3)
Tobacco use	
Never	30 (35.3)
Current	18 (21.2)
Ever	37 (45.5)
<b><i>Clinical</i></b>	
Prescribed TB therapy	
RHZE	24 (17.0)
Especial regimen	1 (0.7)
None	116 (82.3)
HIV test	
Positive	26 (13.5)
Negative	37 (26.2)
Unknown result/not tested	78 (55.3)
Radiological Patterns	
Suggestive of TB	38 (27.0)
Without abnormalities	7 (5.0)
Others abnormalities	37 (26.2)
Not performed	59 (41.8)

CAGE alcohol questionnaire; TB: tuberculosis; RHZE: rifampicin, isoniazid, pyrazinamide, ethambutol.

\* missing values were excluded

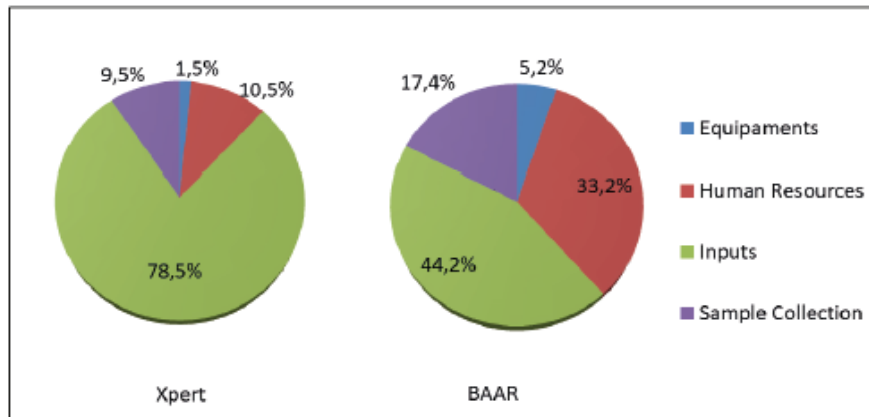
Accuracy assessment of the smear microscopy revealed a sensitivity of 42.9% (95% CI, 24.5–61.2) and a specificity of 99.1% (95% CI, 97.2–100.0). The accuracy assessment of the Xpert assay revealed a sensitivity of 100% (95% CI, 1.00–1.00) and a specificity of 96.7% (95% CI, 93.53–99.88).

Positive Xpert assays and negative culture test results were observed for the samples of two patients in retreatment, while 11 positive culture test results for nontuberculous mycobacteria (NTM) were not detected by the Xpert system.

The average time to smear microscopy results was 16.6 hours and the median time was 9.3 hours (standard deviation, 15.1 hours; range, 1.2–48 hours). The mean time to completion of the Xpert assay was 24.1 hours, with a median time of 24 hours (standard deviation, 18.2 hours; range, 2–72 hours).

### **Cost analysis**

The mean cost of the Xpert assay was USD 17.37 with an ABC value of USD 10.86, while the mean cost of the smear microscopy was USD 13.31 with an ABC value of USD 6.01. Proportionally, the impact of cost components of smear microscopy was lower than that of Xpert, except for the human resources component. The component cost that impacted the mean costs and ABC values of Xpert and smear microscopy are described in Figure 2.



**Figure 2.** The impact of ABC components.

## DISCUSSION

The study revealed that the average time to completion of the Xpert assay result was longer than that of sputum smear microscopy. This is because the slide is read immediately, but the sample undergoes processing in the Xpert system. In addition, the fact that in our laboratory we use the equipment with only four modules might also play a role. Nevertheless, although smear microscopy is cheaper than the Xpert assay, the latter is more accurate.

The advantage of the Xpert system is that it offers the possibility for a fully automated test after insertion of the clinical specimen into the cartridge. Assay steps (DNA extraction, amplification, and detection) are independent of manual technical interventions, thus minimizing analytical errors and improving quality control<sup>3</sup>.

The sensitivity and specificity values found in this study (100% and 96.7%, respectively) are similar to the results of a meta-analysis that included 27 studies with a total of 9500 specimens analyzed using the Xpert system, and which presented a range of sensitivity between 58% and 100% and specificity between 86% and 100%<sup>3</sup>.

The specificity was found to be lower than the sensitivity due to the presence of *M. tuberculosis* complex DNA in two cases of treatment control patients who presented negative culture tests. Therefore, the recommendation not to use the Xpert system for treatment control should be reinforced, except for probable TB in new cases, if resistance to rifampicin or multidrug resistance is suspected.

In this study, the Xpert system did not show false positive results among NTM isolates, mainly due to the increase in prevalence of disease-associated NTM, as has already been described by other authors<sup>15-17</sup>. Therefore, NTM should be suspected in conditions where smear microscopy tests yield positive results and are undetected by the Xpert assay<sup>18</sup>. Our data agree with the results of a meta-analysis that evaluated 14 studies including 180 NTM cases and showed that the false positivity of the Xpert assay for these pathogens was only 0.6%<sup>3</sup>.

The average times extrapolated from the results (16.3 and 24 hours for smear microscopy and Xpert assay, respectively) are due to the fact that the laboratory does not work at night, on weekends, and holidays with processing of samples with NALC/NaOH; thus, the clinical samples are stored for the test to be carried out on the next business day. The recommendation of the Ministry of Health and reinforced by other authors is that routine results should be released within 24 hours<sup>11,18,20,21</sup>, which was seen from the mean of our results.

The ABC value of the Xpert assay was higher than that of smear microscopy and the input was the component with the greatest impact. However, it should be noted that the Xpert system is subsidized in Brazil<sup>22</sup>. Efforts are being made to increase the coverage area of the Xpert system worldwide through subsidies to make it available in developing and underdeveloped countries, where health systems work under heavy economic constraints<sup>22,23</sup>.

This is mainly due to the demand of exclusive inputs from the supplier that are imported and undergo exchange variation, which is a dynamic and sensitive variable to the economic scenario of each country<sup>24</sup>.

When incorporating new technology and comparing it with already existing technology, it is important to evaluate all operational and technical aspects. Managers need to be aware of the relevant outcomes of TB treatment and bacillus transmission in the community when evaluating the advantages and disadvantages of incorporating new diagnostic tests<sup>25,26</sup>.

The results described in this paper should alert Brazilian researchers to the need for the development and validation of a national molecular test. Although the Xpert system has high accuracy in the diagnosis of TB, national technological independence is necessary to ensure that cost is not a variable that hinders or even impedes the incorporation of a tool that is effective for the rapid and accurate diagnosis of TB<sup>22,27</sup>.

The results should not be extrapolated to other scenarios owing to differences in the components analyzed. Thus, each site must perform its own analysis.

In conclusion, the Xpert assay has high accuracy; however, the time to sputum smear test results and the ABC value were lower than those observed for the Xpert system.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful to the UFMG Postgraduate Program in Infectology and Tropical Medicine, to the Pro Rectory Research/UFMG, and to the Brazilian Tuberculosis Network (REDE TB). We are also grateful to the Minas Gerais Research Support Foundation (FAPEMIG) and the National Research Council.

## **FINANCIAL SUPPORT**

This research was funded by the Minas Gerais Research Support Foundation (FAPEMIG) process numbers: APQ-03266-13 and APQ-00094-12 and the National Research Council (CNPq) (process numbers: 446796/2014 and 310174/2014-7) and the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel of the Ministry of Education of Brazil (CAPES). Dr Isabela Almeida received funds for this work under a pos-doctoral scholarship (process – CNPq/INCT 465318/2014-2).

## **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

LJAF: data collection, development of experiments, building the database, monitoring cost analysis, PhD student, and article writing. SSM: study conception and design, promotion of study financing, data analysis, and article writing. LBS: data collection, typing and conferencing of the database, and article writing. VMS: data collection, typing and conferencing of the database, and article review. SA: cost calculation, cost chain modeling, database conferencing, and article review. MCV: co-coordination of cost study, cost chain modeling, database conferencing, and article writing. ALK: study conception and design, and article review. WSC: study conception and design, promotion of study financing, data analysis, and article writing. CMP: statistical analysis, adjustment of the database, and article writing. INA: coordination of the data collected, adjustment of the database, modeling of the cost analyses, data analysis, and article writing. All the authors read and approved the final manuscript.

## **CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare no conflicts of interests.

**REFERENCES**

1. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2019. Geneva: WHO; 2019. 194p.
2. Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Boehme C, Richter E. Rapid Molecular Detection of Extrapulmonary Tuberculosis by the Automated GeneXpert MTB/RIF System. *J Clin Microbiol.* 2011;49(4):1202-5.
3. 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 Syst Rev.* 2014; 21:CD009593.
4. Molicotti P, Bua A, Zanetti S. Cost-effectiveness in the diagnosis of tuberculosis: choices in developing countries. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(1):24-38.
5. Sagili KD, Muniyandi M, Nilgiriwala KS, Shringarpure KS, Satyanarayana S, Kirubakaran R, et al. Cost-effectiveness of GeneXpert and LED-FM for diagnosis of pulmonary tuberculosis: A systematic review. *PLoS One.* 2018;13:e0205233.
6. Shah M, Chihota V, Coetzee G, Churchyard G, Dorman S. Comparison of laboratory costs of rapid molecular tests and conventional diagnostics for detection of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis in South Africa. *BMC Infect Dis.* 2013;13:352-58.
7. Capone D, Jansen JM, Lopes AJ, do Couto Sant'Anna C, Soares MO, dos Santos Pinto R, et al. Diagnóstico por imagem da tuberculose. *Pulmão RJ.* 2006;15(3):166-74.
8. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Hospital das Clínicas [Internet]. Estrutura Física: Conheça o HC; 2019. [updated 2018 September 19; cited 2019 Sep 29] Available from: <http://www2.ebserh.gov.br/web/hc-ufmg/infraestrutura>.

9. de Almeida IN, Figueredo LJA, Soares VM, Vater MC, Alves S, Carvalho WS, et al. Evaluation of the Mean Cost and Activity Based Cost in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in the Laboratory Routine of a High-Complexity Hospital in Brazil. *Front Microbiol.* 2017;8:249.
10. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília: MS; 2010. 190 p.
11. World Health Organization (WHO). Automated Real-Time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Drug Resistant Tuberculosis: Policy Statement. Geneva: WHO; 2013. 10 p.
12. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Economia da Saúde. Manual Técnico de Custos – Conceitos e Metodologias. Brasília: MS; 2006. 1-71p.
13. Scherer LC, Sperhacke RD, Ruffino-Netto A, Rossetti ML, Vater C, Klatser P, et al. Cost-effectiveness analysis of PCR for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis.* 2009;9:216-20.
14. Banco Central do Brasil (BC). Cotações e Boletins, 2019 [Internet]. [updated 2020 May 19; cited 2020 May 19]. Available from: <https://www.bcb.gov.br/acesoinformacao/legado?url=https:%2F%2Fwww4.bcb.gov.br%2Fpec%2Ftaxas%2Fport%2Fptaxnpsq.asp%3Fid%3Dtxcotacao>.
15. Fernandes HMZ, Conceição EC, Gomes KM, da Silva MG, Dias RCS, Duarte RS. Recovery of Non-tuberculous Mycobacteria from Water is Influenced by Phenotypic Characteristics and Decontamination Methods. *Curr Microbiol.* 2020;77(4):621-31.
16. Bryant J, Grogono D, Rodriguez-Rincon D, Everall I, Brown KP, Moreno P, et al. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science.* 2016;354(6313):751-57.

17. Floto R, Olivier K, Saiman L, Daley CL, Herrmann JL, Nick JA, et al. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacter in individuals with cystic fibrosis. *Thorax*. 2016; 71:Suppl1-22.
18. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: MS; 2019. 55-63p.
19. Rachow A, Zumla A, Heinrich N, Rojas-Ponce G, Mtafya B, Reither K, et al. Rapid and accurate detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by Cepheid Xpert MTB/RIF assay-a clinical validation study. *PLoS One* 2011;6(6):e20458.
20. Chaisson LH, Duong D, Cattamanchi A, Roemer M, Handley MA, Schillinger D, et al. Association of Rapid Molecular Testing With Duration of Respiratory Isolation for Patients With Possible Tuberculosis in a US Hospital. *JAMA Intern Med*. 2018;178(10):1380-88.
21. Chaisson LH, Roemer M, Cantu D, Haller B, Millman AJ, Cattamanchi A, et al. Impact of GeneXpert MTB/RIF assay on triage of respiratory isolation rooms for inpatients with presumed tuberculosis: a hypothetical trial. *Clin Infect Dis*. 2014;59(10): 1353-60.
22. Pinto MFT, Steffen R, Entringer A, Costa ACCD, Trajman A. Budget impact of the incorporation of GeneXpert MTB/RIF for diagnosis of pulmonary tuberculosis from the perspective of the Brazilian Unified National Health System, Brazil, 2013-2017. *Cad Saude Publica*. 2017;33(9):e00214515.
23. Kaur R, Kachroo K, Sharma JK, Vatturi SM, Dang A. Diagnostic Accuracy of Xpert Test in Tuberculosis Detection: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Glob Infect Dis*. 2016;8(1):32-40.

24. Barreira D. Os desafios para a eliminação da tuberculose no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*. 2018;27(1):e00100009.
25. Acuna-Villaorduna C, Vassall A, Henostroza G, Seas C, Guerra H, Vasquez L, et al. Cost-Effectiveness Analysis of Introduction of Rapid, Alternative Methods to Identify Multidrug-Resistant Tuberculosis in Middle-Income Countries. *Clin Infect Dis*. 2008;47(4):487-95.
26. Laranjeira de Oliveira F; Petramale CA. A avaliação econômica em saúde na tomada de decisão: a experiência da CONITEC. *BIS* 2013;14(2):165-70.
27. Drobniewski F, Cooke M, Jordan J, Casali N, Mugwagwa T, Broda A, et al. Systematic review, meta-analysis and economic modelling of molecular diagnostic tests for antibiotic resistance in tuberculosis. *Health Technol Assess*. 2015;19(34):1-188.

#### 4.2. Artigo 2 – A ser submetido na Revista BMC Genomics (A2)

##### **Análise genômica do *Mycobacterium tuberculosis* em Minas Gerais, Brasil.**

**Autores:** Lida Jouca de Assis Figueredo<sup>1</sup>, Richard Steiner Salvato<sup>2</sup>, Flora Martinez Figueira Moreira<sup>3</sup>, Wânia da Silva Carvalho<sup>1,4</sup>, Afrânio Lineu Kritski<sup>5</sup>, João Perdigão<sup>6</sup>, Silvana Spíndola de Miranda<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Pesquisa em Micobactérias, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Centro Estadual de Vigilância em Saúde, Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados.

<sup>4</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>5</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa Acadêmico de Tuberculose, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>6</sup> iMed.Ulisboa – Research Institute for Medicine, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

## Resumo

**Introdução:** A tuberculose é a principal causa de morte entre as doenças infecciosas, e o conhecimento molecular do *Mycobacterium tuberculosis* permite a implementação de medidas mais eficazes para a vigilância e controle da doença. Atualmente, o sequenciamento do genoma completo (WGS) tem potencial para produzir dados epidemiológicos abrangentes. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade, *clusters* genéticos e as mutações do *M. tuberculosis*. **Métodos:** Estudo retrospectivo de análise genômica de 98 isolados do *M. tuberculosis* provenientes de Minas Gerais por meio do WGS. **Resultados:** A tipagem baseada em SNP classificou todos os isolados como linhagem 4, com alta proporção de sublinhagens LAM (73,5%), seguida da sublinhagem Haarlem (12,2%) e T (6,1%). Em relação aos *clusters*, não foram identificadas transmissão recentes. Já os isolados resistentes foram agrupados com maior proximidade (sublinhagem 4.3.4.1). As mutações que conferem resistência foram: 44/98 (44,9%) MDR, 12/98 (12,2%) monoresistentes e 1/98 (1%) XDR. Em 41/98 (41,9%) não foram encontradas mutações. **Conclusão:** A maioria dos isolados era LAM e MDR. Os *clusters* genéticos eram distantes e quando resistentes tinham maior proximidade.

**Palavras-chave:** Tuberculose, resistência, mutações, sequenciamento do genoma completo

## INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) era a principal causa de morte no mundo por um único agente, e foi suplantada devido a pandemia de Covid19[1]. Por conseguinte, a real transmissão da TB ficou subnotificada, pessoas com TB ficaram sem diagnóstico e tratamento adequado[2]. Em 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que houve 558.000 novos casos de TB Multidroga Resistente (MDR) e 230.000 mortes associadas à TB-MDR em todo o mundo[1].

Um dos principais fatores que contribuem para o aumento de casos é a alta taxa de resistência a vários fármacos que levam a diminuição do tratamento[3]. Neste mesmo ano, cerca de meio milhão de pessoas em todo o mundo desenvolveu *M. tuberculosis (M.tb)* resistente à rifampicina, desses 78% tinham TB-MDR.[1]

Globalmente, estima-se que cerca de 60% dos casos de TB-MDR ocorrem nos países do BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África).[1] Atualmente, o teste de sensibilidade fenotípico é o método padrão para o diagnóstico de resistência aos fármacos. No entanto, são demorados, requerem instalações laboratoriais caras, não estão disponíveis em muitos países de alta carga e não são padronizados para todos os fármacos anti-TB.[4–6]

A identificação precoce da TB resistente (TB-DR) e a avaliação de seus contatos são essenciais para prevenir a disseminação de TB resistente a rifampicina (TB-RR)/TB-MDR e melhorar a taxa de sucesso do tratamento anti-TB[7, 8]. Nesse cenário, o sequenciamento do genoma completo (WGS) permite a análise do genoma do *M.tb* permitindo a predição de mutações que conferem resistência, SNP com alto poder discriminatório para avaliação da transmissão e identificação de diferentes cepas[9, 10], contribuindo também para a detecção precoce de surtos, o monitoramento da cadeia de transmissão e o controle da doença[11].

Diante disso, o WGS facilita a compreensão dos mecanismos evolutivos que moldam a epidemiologia da TB[12]. No entanto, no Brasil existem poucos estudos com análise genômica de cepas *M.tb* circulantes[13–17], sendo este o primeiro estudo genômico realizado no Estado de Minas Gerais.

Devido a necessidade global de vigilância da transmissão da TB, foi realizada uma análise baseada no WGS, com o objetivo de avaliar a filogenia, *clusters* genéticos e as mutações do *M.tb* das cepas circulantes no Estado de Minas Gerais.

## **MÉTODO**

### ***Desenho do estudo***

Foram selecionadas 98 isolados do *M.tb* provenientes de amostras pulmonares no período de 2008 a 2017. Os isolados foram selecionados por conveniência em torno de 1:1 (TB-MDR e sensíveis). Os dados sociodemográficos, fatores de risco, comorbidades, tratamento prévios e desfechos foram obtidos por meio de dados originados do Sistema de Informação de Tratamentos Especiais da Tuberculose (SITETB) e Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

Dos isolados estocados no Laboratório de Pesquisa em Micobactérias/Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 54 isolados eram provenientes do Hospital Julia Kubitschek, Referência Terciária no tratamento da TB; 30 do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais (LACEN-MG) do Instituto Octavio Magalhães da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e 14 do Hospital de Alta Complexidade/Hospital das Clínicas/UFMG.

### ***Cultura de MTB***

O *M.tb* foi isolado de amostras de escarro ou lavado bronco alveolar. O isolamento do complexo *M.tb* foi realizado em meio MGIT 960<sup>®</sup> ou em Lowenstein-Jensen[18].

### ***Teste fenotípico***

O teste de sensibilidade aos fármacos foi realizado utilizando BACTEC<sup>™</sup> MGIT<sup>™</sup> 960 SIRE para o sistema BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 (MGIT 960<sup>®</sup>) (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD) de acordo com instruções do fabricante[19] para estreptomicina (STR, 1 µg/mL), isoniazida (INH, 0,1 µg/mL), rifampicina (RIF, 1 µg/mL) e etambutol (EMB, 4,5 µg/mL).

### ***Extração de DNA e controle de qualidade***

O DNA genômico do *M.tb* foi extraído da cultura em meio sólido Lowenstein-Jensen por meio do método de Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB)[20] e adaptado por Dantas *et al.*, 2015[21]. O controle de qualidade do DNA foi baseado na medição da absorbância (razão A260/A280 > 1.8)[22], a quantificação do DNA por meio do equipamento SpectraMax Plus<sup>®</sup> e o controle quanto à integridade em eletroforese de gel de agarose 0,7%.

### ***Sequenciamento do genoma completo (WGS)***

A biblioteca de DNA genômico foi preparada usando NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> II Kit de preparação para Illumina (New England BioLabs, Código E7645L). Adaptadores e oligos de índice de 8 bp adquiridos de IDT<sup>®</sup> (DNA integrado Technologies, San Diego, CA) com base em Kozarewa e Turner (2011), foram usados no lugar daqueles fornecidos no kit de preparação NEB

em uma abordagem de indexação dupla (N.E. et al., 2016). Sequenciamento de extremidade pareada ( $2 \times 150$  bp) foi pela Illumina NextSeq usando um kit de saída média ou alta saída 300 ciclos v2 (Illumina, Código FC- 404-2003 ou Código FC-404-2004) usando o procedimento padrão Illumina®.

### ***Bioinformática e análise de dados***

O controle de qualidade da leitura das *reads* foi realizado usando FastQC (v0.11.7), em seguida as *reads* foram cortadas para remover as sequências de adaptadores e as de baixa qualidade usando *trimmomatic* (v0.33), sob os parâmetros: LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:36)[23].

As *reads* filtradas foram então mapeadas com o genoma de referência *M. tb* H37Rv (NC\_000962.3) usando algoritmo implementado em BWA-MEM (v0.7.16). Posteriormente, o programa Samtools (v1.9) foi usado para converter do formato SAM para BAM e mapear as sequências [24].

A cobertura e profundidade do mapeamento foi checado por meio dos arquivos BAM usando *Qualimap* [25] e *sambamba* (v0.6.8) foi usado para marcar e eliminar as *reads* duplicatas [26]. Para a identificação das variantes, SNP e pequenos INDEL como deleções e inserções foi usada as ferramentas *Samtools*. As variantes foram filtradas com base nos seguintes critérios: qualidade de mapeamento  $\geq 30$ , qualidade de alinhamento de base  $\geq 23$  e  $\leq 2.000$  leituras cobrindo cada site. Depois, filtramos o arquivo VCF bruto com profundidade de leitura mínima de 10X para definir uma variante. As variantes identificadas foram anotadas usando o programa *snpEff* (v4.3) [27].

As mutações associadas à resistência aos fármacos foram detectadas inicialmente usando pipeline *TB-Profiler* na versão de linha de comando (0.3.0) [28], usando como entrada os arquivos BAM e configurações padrão. Quando necessário, as mutações foram verificadas nos arquivos BAM. As linhagens de *M. tb* foram definidas com base na tipagem de SNP[29] usando código de barra de 62 SNP realizado no *TB-profiler*.

A análise filogenética foi realizada usando pipeline *snippy* v3.1 (<https://github.com/tseemann/snippy>) para a variante e alinhamento de todos os genomas centrais. Posições de SNP dentro de genes PE/PPE ou outras regiões repetitivas associadas com baixa capacidade de mapeamento foram removidas.

Uma árvore filogenética de máxima verossimilhança foi gerada utilizando o software RAxML (v8.10.12), [30] aplicando o modelo generalizado de tempo reversível (GTR), e a árvore resultante foi enraizada usando *M. canettii* (NC\_019950.1). Distâncias genômicas de pares foram obtidas pela ferramenta *snp-dists* e uma árvore geradora mínima usando Phyloviz Online. Um limiar de 5 SNP foi usado para definir *clusters* genômicos [31] entre o alinhamento do genoma central.

### ***Aprovação ética***

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, pelo CAAE nº: 95206318.3.0000.5149.

## RESULTADOS

### *Características da população*

Os participantes incluídos neste estudo eram provenientes do estado de Minas Gerais, 43,9% (43/98) dos pacientes tinham idade entre 30 e 49 anos (mínimo 18; máximo 83) e 70,4% (69/98) eram do sexo masculino. Quanto aos fatores de risco e comorbidades associados à TB, 35% (34/98) apresentavam fatores de risco, sendo o uso de álcool em 13,3% (13/98), de álcool e tabaco em 8,2% (8/98) e tabaco 6,1% (6/98). A coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi de 5,1% (5/98) e diabetes mellitus 4% (4,1%).

Em relação ao tratamento, 45,9% (45/98) dos pacientes tinham história de tratamento prévio, e desses, 73,3% (33/45) trataram para TB mais de uma vez. Dos 12/45 (26,6%) que trataram uma vez, 41,6% (5/12) faliram e 25% (3/12) abandonaram.

### *Teste de sensibilidade (TSA)*

Em 51% (50/98) eram MDR, 42,9% (42/98) sensível e 4,0% (4/98) monorresistentes: 2% (2/98) a STR; 2% (2/98) a INH. Em 1% (1/98) resistente a STR e INH; 1% (1/98) a INH e EMB.

O WGS foi concordante com o MGIT em 82,0% (73/89) para STR; 92,8% (91/98) para INH, 95,9% (94/98) para RIF e 80,4% (74/92) para EMB. Na **Tabela 1** estão descritas as divergências em relação aos resultados fenotípicos e genotípicos.

**Tabela 1.** Divergência entre TSA e WGS

Fármaco	Nº Isolados	TSA	WGS
<b>STR</b>	2	Sensível	<i>rpsL</i> Lys88Thr Lys43Arg
	14	Resistente	sem mutação
<b>INH</b>	7	Resistente	sem mutação
<b>RIF</b>	1	Sensível	<i>rpoB</i> Leu452Pro
	3	Resistente	sem mutação
<b>EMB</b>	15	Sensível	<i>embB</i> Met306Ile (5)
			<i>embB</i> Met306Val (2)
			<i>embB</i> Gly406Asp (2)
			<i>embB</i> Gly745Asp (1)
			<i>embB</i> Gln497Lys (1)
			<i>embB</i> Met306Ile/Gln497Pro (1)
			<i>embB</i> Asp1024Asn/Met306Ile (1)
			<i>embA</i> -11C>A (1)
	<i>embA</i> -16C>G (1)		
3	Resistente	sem mutação	

**Diversidade genética**

O método de tipagem baseada em SNP, atribuiu linhagem 4 para todas as cepas de *M.tb* e as classificou como Euro-American. A classificação em SNP identificou 16 sublinhagens diferentes, com predominância de 4.3.4.2 (LAM) em 22/98 (22,4%), 4.3.4.1 (LAM) em 21/98 (21,4%), 4.3.3 (LAM) em 19/98 (19,35) e 4.1.2.1 (12,2%) (Haarlem). As outras linhagens foram inferiores a 10% e estão representadas na Tabela 1.

**Tabela 2.** Relação de cepas por linhagem e sublinhagem.

Linhagem/Sublinhagem	n	Resistência aos fármacos (n)			
		Sensível	Monorresistente	MDR	XDR
4	Euro-American	1	0	0	0

4.1.1.1	X-type	2	0	1	1	0
4.1.2	Euro-American	2	2	0	0	0
4.1.2.1	Haarlem	12	7	2	3	0
4.3	LAM	1	0	0	1	0
4.3.2	LAM	7	2	2	3	0
4.3.3	LAM	19	10	2	6	1
4.3.4	LAM	1	0	0	1	0
4.3.4.1	LAM	21	3	2	16	0
4.3.4.2	LAM	22	12	3	7	0
4.3.4.2.1	LAM	1	1	0	0	0
4.4.1	S-type	1	0	0	1	0
4.4.1.1	Euro-American	1	0	0	1	0
4.7	mainly-T	2	2	0	0	0
4.8	mainly-T	4	0	0	4	0
4.9	Euro-American	1	1	0	0	0
<b>TOTAL</b>		<b>98</b>	<b>41</b>	<b>12</b>	<b>44</b>	<b>1</b>

Todas as 62 cepas (63,2%) atribuídas às sublinhagens 3.4.4.1, 4.3.4.1 e 4.3.3 (LAM) carregavam o polimorfismo fbpC 103, conhecido marcador LAM. O RD174 foi encontrado em todas as cepas 4.3.4.1 e 4.3.4.2 e RD115 foi encontrado em todas nas cepas 4.3.3 e revelou 33 SIT diferentes entre as 98 cepas. Os SIT mais comuns foram 42/LAM9 em 18/98 (18,3%) cepas, 53/T1 em 10/98 (10,2%) cepas, 17/LAM2 em 9/98 (9,1%) cepas, 20/LAM1 em 8/98 (8,1%) cepas e 33/LAM3 em 5/98 (5,1%). E não houve nenhum SIT em 9/98 (9,1%) cepas (**Figura 1**).

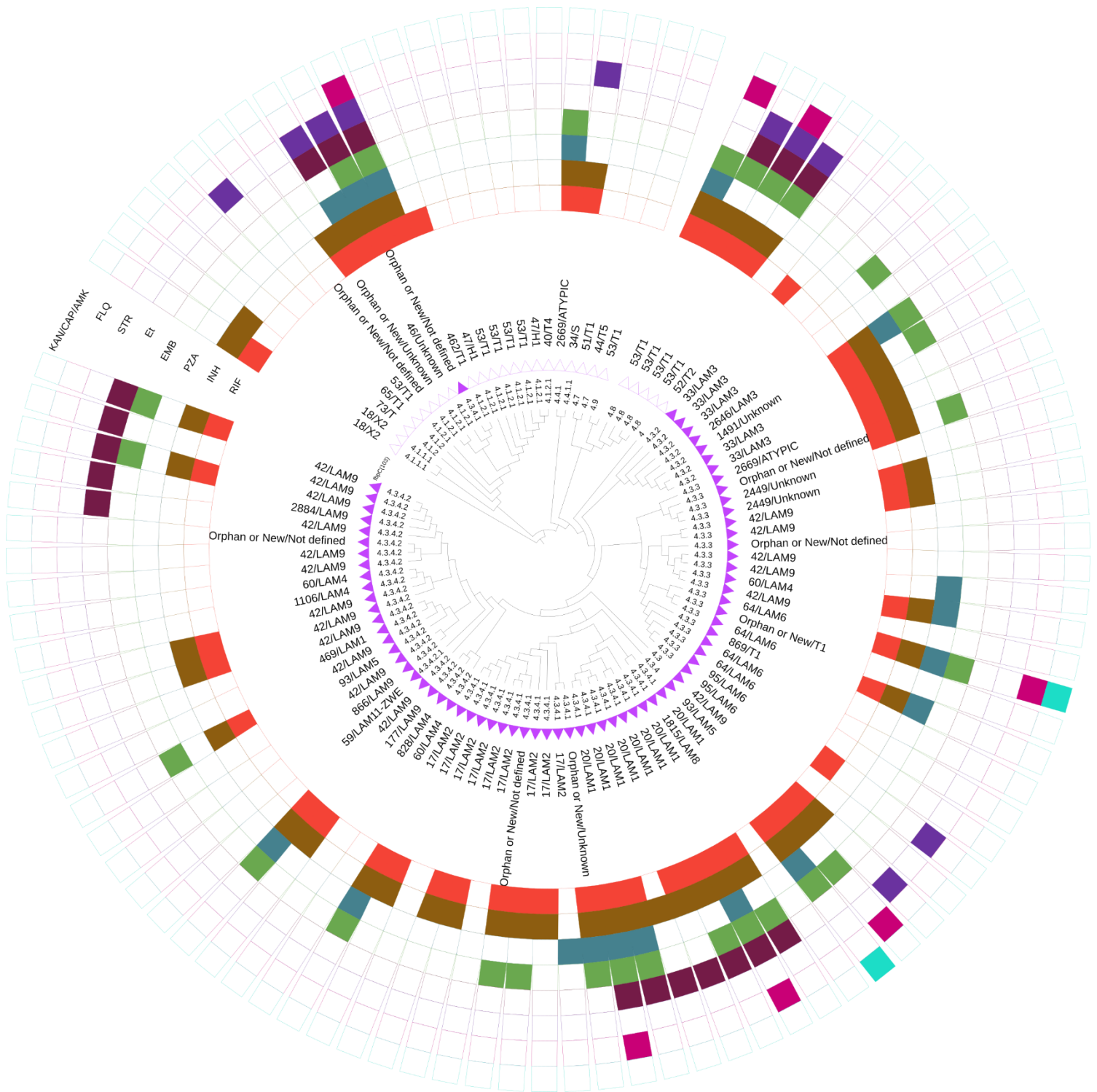
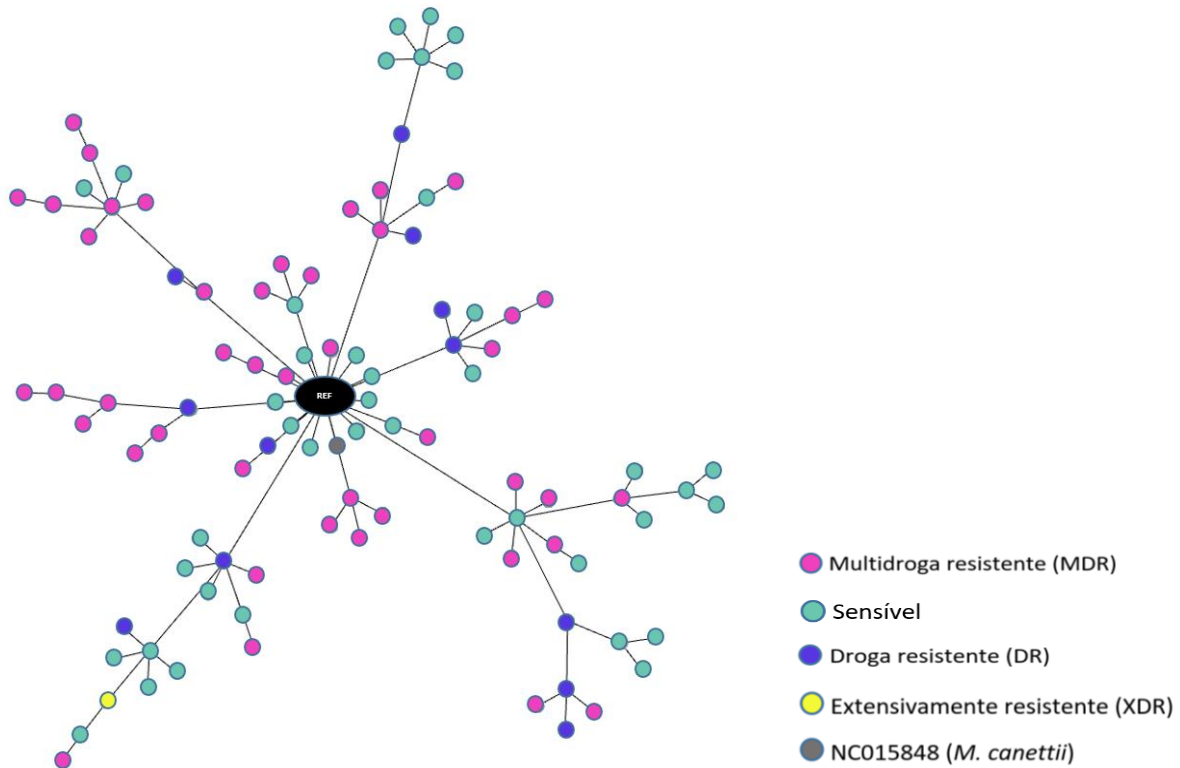


Figura 1. Árvore filogenética de máxima verossimilhança dos 98 isolados *M. tuberculosis*.

A menor distância entre dois isolados foi de 28 SNP, não havendo *clusters*. O SNP identificou 44/98 (44,9%) TB-MDR, 12/98 (12,2%) monoresistentes e 1/98 (1%) extensivamente resistente (TB-XDR). Em 41/98 (41,9%) não foram encontradas mutações. (**Figura 2**)



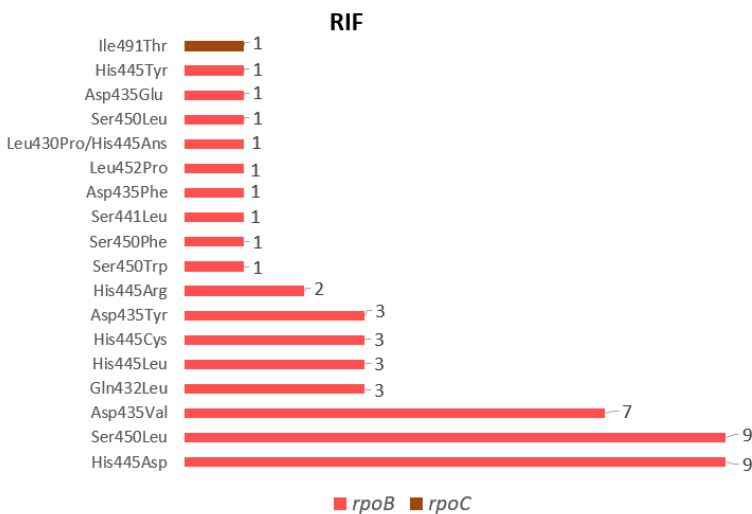
**Figura 2.** Árvore de distanciamento dos SNP dos 98 isolados.

### ***Resistência aos fármacos e mutações associadas***

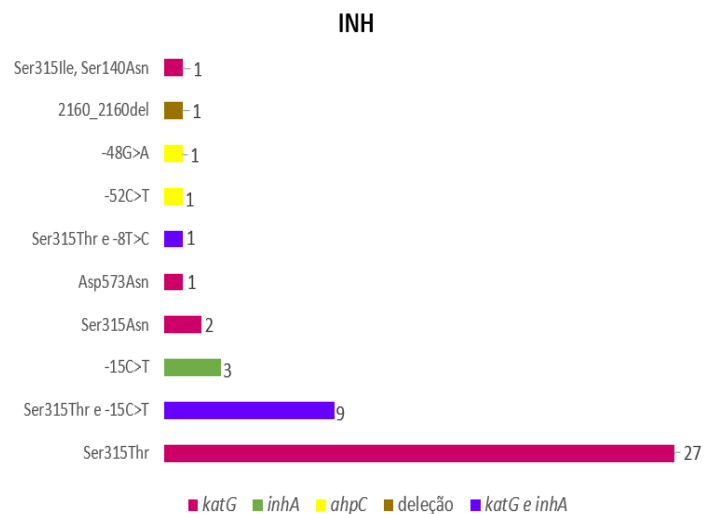
O perfil de resistência para os fármacos de primeira linha detectado pelo WGS apresentou 48/98 (48,9%) isolados com resistência à RIF, 47/98 (47,9%) resistentes à INH, 18/98 resistente a PZA e 27/98 (27,5%) resistente ao etambutol (E). Para os fármacos de segunda linha, foram identificados 18/98 isolados resistentes à etionamida (Et), dentre os aminoglicosídeos 10/98 (10,2%) a estreptomicina (STR), 2/98 (1%) com resistência concomitante para amicacina (AMK)/canamicina (KAN)/ capreomicina (CAP) e 7/98 (7,1%) para fluoroquinolonas (FQL).

Essas resistências foram representadas na árvore de máxima verossimilhança construída com base nos principais SNP foi apresentada de dentro para fora o SIT e clado do Spoligotyping; presença ou ausência do marcador fbpC103 LAM; sublinhagem baseada em SNP; e os quadrados coloridas mutações associadas à resistência aos fármacos de acordo com a predição do WGS. **(Figura 1)**

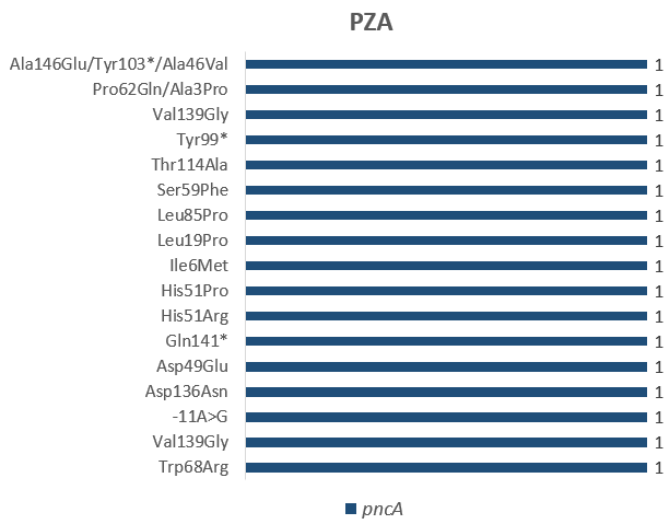
As mutações mais frequentes foram Ser450Leu, His445Asp e Asp435Val, concentrando 79,1% (38/48) da resistência à RIF nesses três códons do gene *rpoB*. Para a INH, a mutação Ser315Thr no gene *katG* foi a mais frequente, ocorrendo em 78% (37/47) dos isolados. As mutações para PZA estavam distribuídas em vários códons do gene *pncA*. A resistência para o EMB estava associada ao códon 306 com as mutações Met306Ile e Met306Val. As mutações encontradas estão descritas nos **Gráficos 1-4**.



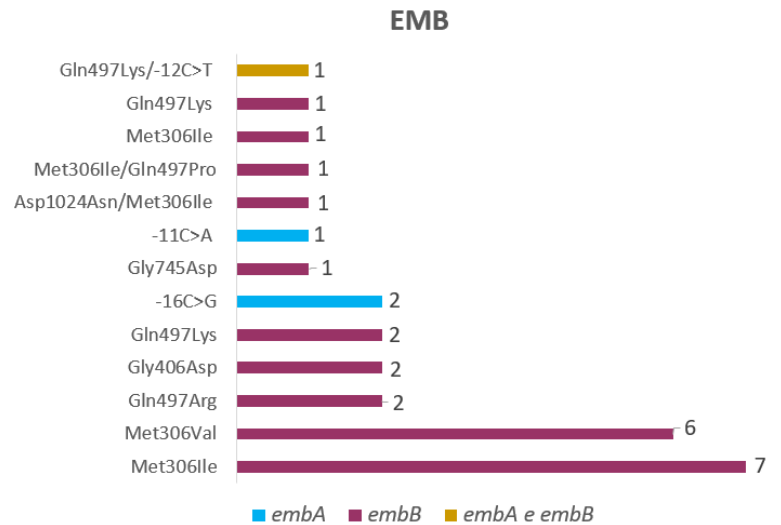
**Gráfico 1.** Mutações associadas a RIF.



**Gráfico 2.** Mutações associadas a INH.



**Gráfico 3.** Mutações associadas a PZA.



**Gráfico 4.** Mutações associadas a EMB.

Dentre os aminoglicosídeos, as mutações a STR estavam distribuídas no gene *rpsL* no códon 43 com a mutação Lys43Arg e no códon 88, com as mutações Lys88Arg e Lys88Thr. Para a Et as mutações estavam concentradas no códon -15C>T do gene *fabG1* e a mutação Arg463Ser no gene no *ethA*. As resistências às FLQ estavam associadas ao gene *gyrA*, nos códons 94 e 90, com as mutações Asp94Gly e Ala90Val, respectivamente. E a resistência concomitante aos fármacos da AMK/KAN/CAP foi detectado no códon 1401a>g do gene *rrs*. (**Tabela 3**)

**Tabela 3.** Frequência de mutações associadas aos fármacos segunda linha, injetável e fluoroquinolonas.

Fármacos	n	<i>rrs</i>	<i>rpsL</i>
STR			
	3		102_102del
	2		Lys88Arg
	2		Lys43Arg
	2	517c>t	
	1		Lys88Thr

<b>Et</b>		<b><i>fabG1</i></b>	<b><i>ethA</i></b>	
	10	-15C>T		
	5		Arg463Ser	
	3	-15C>T		c.884 884del
	1		c.1310 1311insG	
	1		c.777 778insGC	
	1		c.1093_1093del	
	1		c.1154_1155insTTGG	
<b>FLQ</b>	<b>n</b>	<b><i>gyrA</i></b>	<b><i>gyrB</i></b>	
	2	Asp94Gly		
	2	Ala90Val		
	1	Asp94Tyr		
	1	Ser91Pro/Asp94Asn		
	1	Gly88Cys	Asp461His	
<b>AMK/KAN/CAP</b>		<b><i>rrs</i></b>		
	2	1401a>g		

Também foram analisados genes relacionados aos fármacos, ácido para-aminossalicílico (PAS), cicloserina, linezolida, bedaquilina, clofazimina e delamanide, mas não foram detectadas mutações ou deleções que conferem resistência.

## DISCUSSÃO

Os dados observados do WGS são relevantes, pois é o primeiro dado descrito no estado de Minas Gerais e o segundo estudo da região Sudeste do Brasil e, enfatiza a importância de abordagens baseadas em WGS que permitam as análises filogenéticas para investigar a transmissão de *M.tb* bem como a diversidade genética e a predição de resistência, aprimorando o conhecimento sobre a dinâmica de cepas de *M.tb* circulantes no estado de Minas Gerais.

Nós encontramos o perfil de homens, adultos jovens, soronegativos para HIV, tabagistas, que faziam uso de drogas ilícitas e álcool, com história de TB prévio e elevada proporção de abandono do tratamento, como descrito em outros estudos realizados no Brasil[32, 33].

No geral, a predição genômica de resistência mostrou boa concordância com o teste fenotípico, corroborando com dados globais.[34, 35] A discordância entre o TSA e o WGS pode ser decorrente de alguns fatores, tais como deficiências nas bases de dados utilizadas para a interpretação, fármacos em que apesar do *breakpoint* estabelecido no TSA o comportamento da bactéria *in vitro* é diferente, e a presença de mutações que causam resistência de baixo nível[5, 36, 37], como ocorrem para STR e EMB. Em relação a STR, pode estar associado com a linhagem 4 na qual o desempenho preditivo genômico é ruim para este fármaco[37, 38].

Para o EMB há diversas questões, tal como a presença de micro colônias difíceis de detectar a olho nu e a estreita faixa entre o *breakpoint* e a concentração inibitória mínima[39]. Além disso, as duas mutações mais frequentes neste estudo para esse fármaco, Met306Val e Met306Ile, foram associadas a sensibilidade reduzida de *M.tb* devido a concentração inibitória mínima estar logo acima da concentração crítica, o que pode ocasionar resistência limítrofe ou intermediária[40].

Observou-se um achado relevante na comparação molecular *versus* fenotípica para a RIF devido a presença de mutação Leu452Pro no gene *rpoB*, que está associada ao baixo nível de resistência e pode apresentar sensibilidade fenotípica devido à dificuldade de crescimento em meio líquido[41].

A análise filogenética identificou a prevalência da linhagem 4, provavelmente devido ao processo migratório da Europa para a América do Sul, havendo prevalência desta linhagem em todo o Brasil[13, 14, 42]. A estrutura populacional de *M.tb* em Minas Gerais foi composta principalmente por cepas LAM e Haarlem, com predominância da sublinhagem 4.3.4.2 fortemente

associadas com cepas MDR, como em um estudo do Sul do Brasil[14]. A distribuição do SNP *fbpC103* é considerado um marcador altamente específico para a família LAM e foi predominantemente identificado nesse estudo, bem como em outros estudos brasileiros[14, 43–45].

Não foi observado *clusters* genômicos na análise dessas 98 cepas, demonstrando não haver transmissão recente de *Mtb*. O distanciamento mínimo foi de 28 SNP e para ocorrer *cluster* é necessário uma maior proximidade[46]. A ausência de *cluster* pode se justificar devido ao fato de Minas Gerais ser o terceiro estado do país com menor incidência de casos de TB[47] e poucos casos de TB-MDR. Neste estudo, a maioria dos casos TB-MDR eram casos de resistência secundária, ou seja, a resistência ocorria devido ao abandono e falência de tratamento e não por meio de transmissão direta de cepas previamente resistentes.

Os principais genótipos associados à resistência incluem mutações de alta confiança encontradas no *katG* Ser315Thr para INH; *rpoB* Ser450Leu para RIF, *embB* Met306Val para EMB e *gyrA* Asp94Gly para FLQ, semelhantes aos já publicados[43, 48–50]

A resistência a RIF foi causada principalmente por variantes que apresentavam das mutações *rpoB* His445Asp, Ser450Leu e Asp435Val, evidenciando a disseminação dessas cepas altamente resistentes na população[51]. A ocorrência da mutação Asp435Tyr, His445Leu, His445Ans, Leu452Pro no gene *rpoB* confere baixo nível de resistência[52], sendo preocupante pois esses pacientes tiveram como desfecho, abandono e falência, além de vários tratamentos prévios, bem como as outras mutações encontradas neste trabalho em que estão associadas com resistências fenotípicas e descrita por outros autores[53–55].

A predição de resistência para INH mais comum estava presente no gene *katG*, tanto com a mutação Ser315Thr quanto outras mutações com a troca de aminoácidos no códon 315. Outras

mutações no *katG* foram encontradas em outras regiões, sendo estas a Asp573Asn e Ser140Asn. No gene *inhA* estavam presentes as mutações -15C>T e -8 T>C, todas com resistência fenotípica conhecida[51], e apenas dois isolados apresentaram mutação que conferem resistência no promotor *ahpC* -52C>T e -48G>A e corrobora com outros achados[55].

Da mesma forma, as mutações mais comuns associadas à resistência foram encontradas entre cepas fenotipicamente resistentes a EMB no códon 306 do gene *embB* (Met306Val e Met306Ile)[40], para a Et foram encontradas na região promotora *fabG1* (-15C>T) que está interrelacionada com as mutações e fenótipo resistente a INH[56].

Dentre as diversas mutações detectadas para a PZA, a mutação no -11A>G está associada a cepas que apresentam resistência fenotípica a outros fármacos, tais como RIF, INH, STR[57], como encontrado no nosso estudo. No entanto, devido as divergências entre os métodos, a detecção da resistência genotípica para a PZA é um processo complexo que requer padronização e mais pesquisas[57]

Todas as mutações encontradas estavam associadas ao gene *pncA*, e são descritas que em 87 a 95% dos isolados fenotipicamente resistentes à PZA apresentam mutações não sinônimas no gene *pncA*[58]. Porém, nem todas as mutações no gene *pncA* estão restritas a isolados resistentes, podendo ser sensível quando são sinônimas ou com mutações que não conferem resistência[59].

Mutações que conferem resistência a fluoroquinolonas no gene *gyrA* foram encontradas em seis cepas, e já foram descritas em coleções globais[51]. Destas, uma também apresentou alteração de nucleotídeo (1401a > g) no gene *rrs* relacionada à resistência aos fármacos injetáveis, caracterizando um caso de TB-XDR.

Como limitações do estudo, pode ser devido ao baixo número de culturas e TSA isoladas na região, não realização da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e TSA para fármacos de

segunda linha. No entanto, as cepas do estudo são representativas, já que o Brasil não está entre os países com maior carga de resistências.[60]

## **CONCLUSÃO**

Esses achados revelam a importância da base molecular da resistência aos fármacos em cepas de *M. tb* circulantes em Minas Gerais, Brasil, demonstrando a capacidade de ensaios moleculares na detecção da resistência. Não foi possível identificar eventos de transmissão recente de cepas de *M. tb*, entretanto MDR tinham maior proximidade e associação com a linhagem LAM e sublinhagem 4.3.4.1, ressaltando a necessidade de interromper a cadeia de transmissão e a necessidade de melhorar o controle da TB.

## REFERÊNCIAS

1. WHO. World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. Geneva, Switzerland; 2020.
2. Madhukar Pai, M.D., Ph.D., Tereza Kasaeva, M.D., Ph.D., and Soumya Swaminathan M. **Covid-19's Devastating Effect on Tuberculosis Care — A Path to Recovery**. *N Engl J Med*. 2022;386:1488–90.
3. Niemann S, Köser CU, Gagneux S, Plinke C, Homolka S, Bignell H, et al. **Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints**. *PLoS One*. 2009;4.
4. Lange C, Abubakar I, Alffenaar JWC, Bothamley G, Caminero JA, Carvalho ACC, et al. **Management of patients with multidrug-resistant/ extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: A TBNET consensus statement**. *Eur Respir J*. 2014;44:23–63.
5. Dominguez J, Boettger EC, Cirillo D, Cobelens F, Eisenach KD, Gagneux S, et al. **Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: A TBNET/RESIST-TB consensus statement**. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016;20:24–42.
6. Piersimoni C, Olivieri A, Benacchio L, Scarparo C. **Current perspectives on drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex: The automated nonradiometric systems**. *J Clin Microbiol*. 2006;44:20–8.
7. WHO. **WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment: drug-resistant tuberculosis treatment**. Geneva PP - Geneva: World Health Organization; 2020.
8. Lambregts-van Weezenbeek CSB, Sebek MMGG, van Gerven PJHJ, de Vries G, Verver S, Kalisvaart NA, et al. **Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprint surveillance in The Netherlands: 6 years' experience with nation-wide cluster feedback and cluster monitoring**. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union against Tuberc Lung Dis*. 2003;7 12 Suppl

3:S463-70.

9. Witney AA, Gould KA, Arnold A, Coleman D, Delgado R, Dhillon J, et al. **Clinical application of whole-genome sequencing to inform treatment for multidrug-resistant tuberculosis cases.** *J Clin Microbiol.* 2015;53:1473–83.
10. Pankhurst LJ, del Ojo Elias C, Votintseva AA, Walker TM, Cole K, Davies J, et al. **Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: A prospective study.** *Lancet Respir Med.* 2016;4:49–58.
11. Nikolayevskyy V, Niemann S, Anthony R, van Soolingen D, Tagliani E, Ködmön C, et al. **Role and value of whole genome sequencing in studying tuberculosis transmission.** *Clin Microbiol Infect.* 2019;25:1377–82.
12. Hatherell HA, Colijn C, Stagg HR, Jackson C, Winter JR, Abubakar I. **Interpreting whole genome sequencing for investigating tuberculosis transmission: A systematic review.** *BMC Med.* 2016;14:1–13.
13. Feliciano CS, Namburete EI, Rodrigues Praça J, Peronni K, Dippenaar A, Warren RM, et al. **Accuracy of whole genome sequencing versus phenotypic (MGIT) and commercial molecular tests for detection of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolated from patients in Brazil and Mozambique.** *Tuberculosis.* 2018;110:59–67.
14. Salvato RS, Schiefelbein SH, Regina E, Costa D, Dias CF, Viveiros M, et al. **Genomic-based surveillance reveals high ongoing transmission of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Southern Brazil.** *Int J Antimicrob Agents.* 2021 Oct;58(4):106401.
15. Salvato RS, Costa ERD, Reis AJ, Schiefelbein SH, Halon ML, Barcellos RB, et al. **First insights into circulating XDR and pre-XDR Mycobacterium tuberculosis in Southern Brazil.** *Infect Genet Evol.* 2020;78 July 2019:104127.

16. Verza, M., Scheffer, M.C., Salvato, R.S. et al. **Genomic epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Santa Catarina, Southern Brazil.** Sci Rep 10, 12891 (2020).
17. Walter KS, Tatara MB, da Silva KE, Moreira FMF, dos Santos PCP, de Melo Ferrari DD, et al. **Local and travel-associated transmission of tuberculosis at Central Western border of Brazil, 2014–2017.** Emerg Infect Dis. 2021;27:905–14.
18. BRASIL. **Manual de Recomendações para o Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose e Micobactérias não Tuberculosas de Interesse em Saúde Pública no Brasil.** 2022.
19. Siddiqi SH. **MGIT For BACTEC™ MGIT 960™ TB System.** FIND MGIT Manual. 2006.
20. Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. **Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology.** Journal of Clinical Microbiology. 1993.
21. Dantas NGT, Suffys PN, Carvalho W da S, Gomes HM, de Almeida IN, de Assis LJ, et al. **Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Minas Gerais State, Brazil.** BMC Infect Dis. 2015.
22. Illumina. **Illumina DNA Prep Reference Guide Consumable.** Illumina. 2020.
23. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. **Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data.** Bioinformatics. 2014.
24. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. **The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.** Bioinformatics. 2009.
25. García-Alcalde F, Okonechnikov K, Carbonell J, Cruz LM, Götz S, Tarazona S, et al. **Qualimap: Evaluating next-generation sequencing alignment data.** Bioinformatics. 2012.
26. Tarasov A, Vilella AJ, Cuppen E, Nijman IJ, Prins P. **Sambamba: Fast processing of NGS alignment formats.** Bioinformatics. 2015.

27. Cingolani P, Patel VM, Coon M, Nguyen T, Land SJ, Ruden DM, et al. **Using *Drosophila melanogaster* as a model for genotoxic chemical mutational studies with a new program, SnpSift.** *Front Genet.* 2012.
28. Phelan JE, O’Sullivan DM, Machado D, Ramos J, Oppong YEA, Campino S, et al. **Integrating informatics tools and portable sequencing technology for rapid detection of resistance to anti-tuberculous drugs.** *Genome Med.* 2019;11:1–7.
29. Coll F, McNerney R, Guerra-Assunção JA, Glynn JR, Perdigão J, Viveiros M, et al. **A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains.** *Nat Commun.* 2014;5:4–8.
30. Stamatakis A. **RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies.** *Bioinformatics.* 2014.
31. TM Walker. **Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: A retrospective observational study.** *Lancet Infect Dis.* 2013;13:137–46.
32. Bhering M, Duarte R, Kritski A. **Treatment outcomes and predictive factors for multidrug-resistant TB and HIV coinfection in Rio de Janeiro State, Brazil.** *Int J Tuberc Lung Dis.* 2021;25:292–8.
33. Moreira A da SR, Kritski AL, Carvalho ACC. **Social deerminants of health and catastrophic costs associated with the diagnosis and treatment of tuberculosis.** *J Bras Pneumol.* 2020;46:1–5.
34. CRyPTIC Consortium. **Prediction of Susceptibility to First-Line Tuberculosis Drugs by DNA Sequencing.** *N Engl J Med.* 2018;379:1403–15.
35. Miotto P, Tessema B, Tagliani E, Chindelevitch L, Starks AM, Emerson C, et al. **A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic**

**drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.** Eur Respir J. 2017;50.

36. Papaventsis D, Casali N, Kontsevaya I, Drobniowski F, Cirillo DM, Nikolayevskyy V. **Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of drug resistance: a systematic review.** Clinical Microbiology and Infection. 2017;23:61–8.

37. Schleusener V, Köser CU, Beckert P, Niemann S, Feuerriegel S. ***Mycobacterium tuberculosis* resistance prediction and lineage classification from genome sequencing: Comparison of automated analysis tools.** Sci Rep. 2017;7 September 2016:1–9.

38. Mahé P, Azami M El, Barlas P, Tournoud M. **A large scale evaluation of tbprofiler and mykrobe for antibiotic resistance prediction in mycobacterium tuberculosis.** PeerJ. 2019;2019.

39. Madison B, Robinson-Dunn B, George I, Gross W, Lipman H, Metchock B, et al. **Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by agar proportion and radiometric methods.** J Clin Microbiol. 2002;40:3976–9.

40. Sirgel FA, Warren RM, Streicher EM, Victor TC, Van Helden PD, Böttger EC. **EmmB 306 mutations as molecular indicators to predict ethambutol susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*.** Chemotherapy. 2013;58:358–63.

41. Miotto P, Cabibbe AM, Borroni E, Degano M, Cirillo DM. **Role of disputed mutations in the rpoB gene in interpretation of automated liquid MGIT culture results for rifampin susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis.** J Clin Microbiol. 2018;56:1–9.

42. Conceição EC, Salvato RS, Gomes KM, Dos Santos Guimarães AE, Da Conceição ML, De Paula Souza E Guimarães RJ, et al. **Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil before the whole genome sequencing era: A literature review.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2021;116:1–14.

43. Salvato RS, Schiefelbein S, Barcellos RB, Praetzel BM, Anusca IS, Esteves LS, et al. **Molecular characterisation of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a high-burden tuberculosis state in Brazil.** *Epidemiol Infect.* 2019;147.
44. Nogueira CL, Prim RI, Senna SG, Rovaris DB, Maurici R, Rossetti ML, et al. **First insight into the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina, southern Brazil.** *Tuberculosis.* 2016;97:57–64.
45. Perdigão J, Silva C, Diniz J, Pereira C, Machado D, Ramos J, et al. **Clonal expansion across the seas as seen through CPLP-TB database: A joint effort in cataloguing *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Portuguese-speaking countries.** *Infect Genet Evol.* 2019;72 March 2018:44–58.
46. Roetzer A, Diel R, Kohl TA, Rückert C, Nübel U, Blom J, et al. **Whole Genome Sequencing versus Traditional Genotyping for Investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* Outbreak: A Longitudinal Molecular Epidemiological Study.** *PLoS Med.* 2013;10.
47. BRASIL. **Boletim Epidemiológico de Tuberculose.** Ministério da Saúde, Secr. Vigilância em Saúde. 2022.
48. Verza M, Scheffer MC, Salvato RS, Schorner MA, Barazzetti FH, Machado H de M, et al. **Genomic epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina, Southern Brazil.** *Sci Rep.* 2020;10:1–11.
49. Quan TP, Bawa Z, Foster D, Walker T, del Ojo Elias C, Rathod P, et al. **Evaluation of whole-genome sequencing for mycobacterial species identification and drug susceptibility testing in a clinical setting: A large-scale prospective assessment of performance against line probe assays and phenotyping.** *J Clin Microbiol.* 2018;56:1–14.
50. Liu D, Huang F, Zhang G, He W, Ou X, He P, et al. **Whole-genome sequencing for**

**surveillance of tuberculosis drug resistance and determination of resistance level in China.**

Clin Microbiol Infect. 2022;28:731.e9-731.e15.

51. Crook DW, Peto TEA, Hoosdally SJ, Cruz ALG, Walker AS, Walker TM, et al. **A data compendium associating the genomes of 12,289 *Mycobacterium tuberculosis* isolates with quantitative resistance phenotypes to 13 antibiotics.** PLoS Biol. 2022;20:e3001721.

52. Köser CU, Georghiou SB, Schön T, Salfinger M. **On the consequences of poorly defined breakpoints for rifampin susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis complex.** J Clin Microbiol. 2021;59:1–11.

53. Berrada ZL, Lin SYG, Rodwell TC, Nguyen D, Schechter GF, Pham L, et al. **Rifabutin and rifampin resistance levels and associated rpoB mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex.** Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;85:177–81.

54. Jamieson FB, Guthrie JL, Neemuchwala A, Lastovetska O, Melano RG, Mehaffy C. **Profiling of rpoB mutations and MICs for rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis*.** J Clin Microbiol. 2014;52:2157–62.

55. Tessema B, Nabeta P, Valli E, Albertini A, Collantes J, Lan NH, et al. **FIND tuberculosis strain bank: A resource for researchers and developers working on tests to detect mycobacterium tuberculosis and related drug resistance.** J Clin Microbiol. 2017;55:1066–73.

56. Rueda J, Realpe T, Mejia GI, Zapata E, Rozo JC, Ferro BE, et al. **Genotypic analysis of genes associated with independent resistance and cross-resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates.** Antimicrob Agents Chemother. 2015;59:7805–10.

57. Sodja E, Koren S, Toplak N, Truden S, Žolnir-Dovč M. **Next-generation sequencing to characterise pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from two Balkan countries.** J Glob Antimicrob Resist. 2022;29:507–12.

58. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. **Tuberculosis drug resistance mutation database.** PLoS Med. 2009;6:0132–6.
59. Streicher EM, Maharaj K, York T, Van Heerden C, Barnard M, Diacon A, et al. **Rapid sequencing of the *Mycobacterium tuberculosis* pncA gene for detection of pyrazinamide susceptibility.** J Clin Microbiol. 2014;52:4056–7.
60. WHO. World Health Organization. **Global tuberculosis control: WHO report.** Geneva, Switzerland; 2018.

## 5. CONCLUSÃO

O estudo do custo do diagnóstico laboratorial da TB é importante para compreender a dinâmica de manutenção da rotina laboratorial, bem como para a incorporação de novas tecnologias. Vale ressaltar a necessidade de utilizar metodologias de acordo com a realidade de cada local, para melhorar a gestão de recursos no sistema de saúde existente.

Na análise genômica de *M. tuberculosis* no estado de Minas Gerais observou-se que a linhagem 4.3.4.1 está relacionada com os casos de TB-MDR. Os resultados obtidos destacam a necessidade da constante realização de estudos de epidemiologia molecular para o monitorando da TB.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, K. et al. **Custeio Baseado em Atividades (ABC) e Custeio Baseado em Atividade e Tempo (TDABC) em Organizações Hospitalares: Uma Análise Descritiva da Literatura Nacional e Internacional.** Revista de Gestão em Sistemas de Saúde, v. 5, n. 2, p. 24–38, 1 dez. 2016.

Bogen, E. **Detection of tubercle bacilli by fluorescence microscopy.** Amer. Rev. Tuberc., 44:267-71, 1941.

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. **Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data.** Bioinformatics. 2014.

Bonacim, C. A. G.; ARAUJO, A. M. P. DE. **Gestão de custos aplicada a hospitais universitários públicos: a experiência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.** Revista de Administração Pública, v. 44, n. 4, p. 903–931, ago. 2010.

BRASIL. **Programa Nacional de Gestão de Custos.** Manual Técnico de Custos-Conceitos e Metodologias. 2006.

BRASIL. **Brasil Livre da Tuberculose: Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública.** In Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 2017.

BRASIL. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Tuberculose 2020.** Boletim Epidemiológico Especial. 2020.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico de Tuberculose.** Ministério Da Saúde, Secretaria de Vigilância Em Saúde. 2022.

Cingolani, P., Patel, V. M., Coon, M., Nguyen, T., Land, S. J., Ruden, D. M., & Lu, X. **Using *Drosophila melanogaster* as a model for genotoxic chemical mutational studies with a new program, SnpSift.** Frontiers in Genetics. 2012.

Coll, F., McNerney, R., Guerra-Assunção, J. A., Glynn, J. R., Perdigão, J., Viveiros, M., Portugal, I., Pain, A., Martin, N., & Clark, T. G. **A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains.** Nature Communications. 2014. 5, 4–8.

De Almeida, I. N. et al. **Evaluation of the Mean Cost and Activity Based Cost in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in the Laboratory Routine of a High-Complexity Hospital in Brazil.** Frontiers in Microbiology, v. 8, 15 fev. 2017.

D.W. Dowdy et al. **Cost-effectiveness of rapid susceptibility testing against second-line drugs for tuberculosis.** Int J Tuberc Lung Dis. 2018(6): 647–654.

Ejalu DL, Irioko A, Kirabo R, et al. **Costeffectiveness of GeneXpert Omni compared with GeneXpert MTB/Rif for point-of-care diagnosis of tuberculosis in a low-resource, high-burden setting in Eastern Uganda: a cost-effectiveness analysis based on decision analytical modelling.** *BMJ Open* 2022;12:e059823.

Freiman, D. & Mokotoff, G. **Demonstration of tubercle bacilli by fluorescence microscopy.** *Amer. Rev. Tuberc.*1943. 48:435-42.

Gagneux, S. **Genetic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*.** *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2013.

García-Alcalde, F., Okonechnikov, K., Carbonell, J., Cruz, L. M., Götzt, S., Tarazona, S., Dopazo, J., Meyer, T. F., & Conesa, A. **Qualimap: Evaluating next-generation sequencing alignment data.** *Bioinformatics*. 2012.

Groessl, E. J., Ganiats, T. G., Hillery, N., Trollip, A., Jackson, R. L., Catanzaro, D. G., Rodwell, T. C., Garfein, R. S., Rodrigues, C., Crudu, V., Victor, T. C., & Catanzaro, A. **Cost analysis of rapid diagnostics for drug-resistant tuberculosis.** *BMC Infectious Diseases*. 2018(1).

Hofmann-Thiel, S., Van Ingen, J., Feldmann, K., Turaev, L., Uzakova, G. T., Murmusaeva, G., Van Soolingen, D., & Hoffmann, H. **Mechanisms of heteroresistance to isoniazid and rifampin of *Mycobacterium tuberculosis* in Tashkent, Uzbekistan.** *European Respiratory Journal* 2009. 33(2), 368–374.

Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., Van Agterveld, M., Van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., & Van Embden, J. **Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology.** *Journal of Clinical Microbiology*. 1997.

Kaso AW, Hailu A. **Costs and costeffectiveness of Gene Xpert compared to smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis using real-world data from Arsi zone, Ethiopia.** *PLoS ONE*. 2021.16(10): e0259056.

Khoury CY, Ancelevicz. **Controvérsias acerca do Sistema de Custos ABC.** *RAE*. 2000. 40, 56-62.

Koch, M. L. & Cote, R. **A comparison of fluorescence microscopy with Ziehl-Neelsen stain for demonstration of acid-fast bacilli in smear preparations and tissue sections.** *Amer. rev. Resp. Dis.*, 1965, 91:283-7.

Lemus, D., Martin, A., Montoro, E., Portaels, F., & Palomino, J. C. **Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004. 54(1), 130–133.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. **The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.** *Bioinformatics*. 2009.

Meehan, C. J., Goig, G. A., Kohl, T. A., Verboven, L., Dippenaar, A., et al. **Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues.** Nature Reviews Microbiology 2019. 17(9), 533–545.

Melo, F. A. F. de, Afiune, J. B., Ide Neto, J., Almeida, E. A. de, Spada, D. T. A., Antelmo, A. N. L., & Cruz, M. L. **Aspectos epidemiológicos da tuberculose multirresistente em serviço de referência na cidade de São Paulo.** Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2003. 36(1), 27–34.

Narain, R. et al. **Microscopy positive and microscopy negative cases of pulmonary tuberculosis.** Amer. Rev. resp. Dis., 1971. 103:761-73.

Pantoja, A., Fitzpatrick, C., Vassall, A., Weyer, K., & Floyd, K. **Xpert MTB/RIF for diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis: A cost and affordability analysis.** European Respiratory Journal. 2013. 42(3), 708–720.

Phelan, J. E., O’Sullivan, D. M., Machado, D., Ramos, J., Oppong, Y. E. A., Campino, S., O’Grady, J., McNerney, R., Hibberd, M. L., Viveiros, M., Huggett, J. F., & Clark, T. G. **Integrating informatics tools and portable sequencing technology for rapid detection of resistance to anti-tuberculous drugs.** Genome Medicine. 2019. 11(1), 1–7.

Ryu, Y. J. **Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Recent Advances and Diagnostic Algorithms.** Tuberculosis and Respiratory Diseases. 2015. v. 78, n. 2, p. 64.

Rüsch-Gerdes, S., Pfyffer, G. E., Casal, M., Chadwick, M., & Siddiqi, S. **Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials.** Journal of Clinical Microbiology. 2006.

Sarin S, Huddart S, Raizada N, Parija D, Kalra A, Rao R, et al. **Cost and operational impact of promoting upfront GeneXpert MTB/RIF test referrals for presumptive pediatric tuberculosis patients in India.** PLoS ONE. 2019. 14(4): e0214675.

Shah, M., Chihota, V., Coetzee, G., Churchyard, G., & Dorman, S. E. **Comparison of laboratory costs of rapid molecular tests and conventional diagnostics for detection of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis in South Africa.** BMC Infectious Diseases. 2013.

Silva, S.C.A., Vater, M.C., Ramalho, D.M.P., Almeida, I.N., Spíndola, S.M., Kritski, A. **Cost-effectiveness of Xpert®MTB/RIF in the diagnosis of tuberculosis: pragmatic study.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2021.

Soares, V. M., de Almeida, I. N., Vater, M. C., Alves, S., Figueredo, L. J. de A., Scherer, L., Kritski, A. L., Carvalho, W. da S., & de Miranda, S. S. **Genotype®MTBDRplus and xpert®MTB/RIF in the diagnosis of tuberculosis and resistant tuberculosis: Cost analysis in a tertiary referral hospital.** Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2020. 53, 1–6.

Stamatakis, A. **RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies**. Bioinformatics. 2014.

Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsç-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., De Haas, P., Van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M. C., Fauville, M., Niemann, S., ... Van Soolingen, D. **Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis***. Journal of Clinical Microbiology. 2006. 44(12), 4498–4510.

Tarasov, A., Vilella, A. J., Cuppen, E., Nijman, I. J., & Prins, P. **Sambamba: Fast processing of NGS alignment formats**. Bioinformatics. 2015.

TM Walker. **Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: A retrospective observational study**. The Lancet Infectious Diseases. 2013(2), 137–146.

Toma, T. S. et al. **Avaliação de tecnologias de saúde & políticas informadas por evidências**. São Paulo: Instituto de Saúde, 2017.

Truant, J. P. et al. **Fluorescence microscopy of tubercle bacilli-stained with auramine and rhodamine**. Henry Ford Hosp. Med. Bull. 1962.10:287-96.

Van Embden, J. D. A., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T. M., & Small, P. M. **Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology**. In Journal of Clinical Microbiology. 1993.

WHO. World Health Organization. **A guide to monitoring and evaluation for collaborative TB/HIV activities**. Geneva, Switzerland. 2009.

WHO. World Health Organization. **Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response**. Geneva, Switzerland. 2010.

WHO. World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. Geneva, Switzerland. 2016.

WHO. World Health Organization. **The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide**. Geneva, Switzerland. 2018.

WHO. World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. Geneva, Switzerland. 2020.

WHO. World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. Geneva, Switzerland. 2021.

WHO. World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. Geneva, Switzerland. 2022.

Wyllie, D. H., Davidson, J. A., Grace Smith, E., Rathod, P., Crook, D. W., Peto, T. E. A., Robinson,

E., Walker, T., & Campbell, C. **A Quantitative Evaluation of MIRU-VNTR Typing Against Whole-Genome Sequencing for Identifying *Mycobacterium tuberculosis* Transmission: A Prospective Observational Cohort Study.** EBioMedicine. 2018.

**ANEXOS****Folhas de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

**Projeto: CAAE – 06611912.8.0000.5149**

**Interessado(a): Profa. Silvana Spindola de Miranda  
Departamento de Clínica Médica  
Faculdade de Medicina - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 19 de outubro de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de cepas do Mycobacterium tuberculosis sensíveis e resistentes isoladas em Minas Gerais**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AÇÕES INOVADORAS PARA AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE E TUBERCULOSE RESISTENTE

**Pesquisador:** SILVANA SPINDOLA DE MIRANDA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 95206318.3.0000.5149

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.945.434

## Comprovante do artigo publicado

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical  
Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine

Vol.:53:(e20200314): 2020

<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0314-2020>



## Major Article

## Cost analysis of smear microscopy and the Xpert assay for tuberculosis diagnosis: average turnaround time

*Lida Jouca de Assis Figueredo*<sup>[1]</sup>, *Silvana Spíndola de Miranda*<sup>[2]</sup>,  
*Lucas Benício dos Santos*<sup>[1]</sup>, *Caroline Gontijo Gonçalves Manso*<sup>[1]</sup>, *Valéria Martins Soares*<sup>[3]</sup>,  
*Suely Alves*<sup>[4]</sup>, *Maria Cláudia Vater*<sup>[4]</sup>, *Afrânio Lineu Kritski*<sup>[4]</sup>, *Wânia da Silva Carvalho*<sup>[5]</sup>,  
*Cristiane Menezes de Pádua*<sup>[5]</sup> and *Isabela Neves de Almeida*<sup>[1]</sup>

[1]. Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Pesquisa em Micobactérias, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[2]. Universidade Federal de Minas Gerais, Grupo de Pesquisa em Micobacterioses, Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[3]. Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Hospital Júlia Kubistchek, Laboratório de Microbiologia, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[4]. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa Acadêmico de Tuberculose, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[5]. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, MG, Brasil.

### Abstract

**Introduction:** Rapid and accurate tuberculosis detection is critical for improving patient diagnosis and decreasing tuberculosis transmission. Molecular assays can significantly increase laboratory costs; therefore, the average time and economic impact should be evaluated before implementing a new technology. The aim of this study was to evaluate the cost and average turnaround time of smear microscopy and Xpert assay at a university hospital. **Methods:** The turnaround time and cost of the laboratory diagnosis of tuberculosis were calculated based on the mean cost and activity based costing (ABC). **Results:** The average turnaround time for smear microscopy was 16.6 hours while that for Xpert was 24.1 hours. The Xpert had a mean cost of USD 17.37 with an ABC of USD 10.86, while smear microscopy had a mean cost of USD 13.31 with an ABC of USD 6.01. The sensitivity of smear microscopy was 42.9% and its specificity was 99.1%, while the Xpert assay had a sensitivity of 100% and a specificity of 96.7%. **Conclusions:** The Xpert assay has high accuracy; however, the turnaround time and cost of smear microscopy were lower than those of Xpert.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular diagnostic. Pulmonary tuberculosis. Cost analysis. Health system.