

Isabela Neves de Almeida

Análise do custo do diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar e investigação do  
*Mycobacterium tuberculosis* da sublinhagem RD<sup>Rio</sup> no estado de Minas Gerais

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia

Belo Horizonte – MG 2017

Isabela Neves de Almeida

ANÁLISE DO CUSTO DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TUBERCULOSE  
PULMONAR E INVESTIGAÇÃO DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DA  
SUBLINHAGEM RD<sup>RIO</sup> NO ESTADO DE MINAS GERAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Infectologia e  
Medicina Tropical, como requisito  
para a obtenção do título de Doutora  
em Ciências da Saúde: Infectologia e  
Medicina Tropical.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Silvana Spíndola de Miranda

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Wânia da Silva Carvalho

Belo Horizonte 2017

Almeida, Isabela Neves de.  
A447a Análise do custo do diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar e investigação do Mycobacterium tuberculosis da sublinhagem RDRio no estado de Minas Gerais [manuscrito]. / Isabela Neves de Almeida. - - Belo Horizonte: 2017.  
65f.: il.  
Orientador: Silvana Spindola de Miranda.  
Coorientador: Wânia da Silva Carvalho.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.  
1. Tuberculose/diagnóstico. 2. Mycobacterium tuberculosis. 3. Epidemiologia Molecular. 4. Custos e Análise de Custo. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Miranda, Silvana Spindola de. II. Carvalho, Wânia da Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WF 200

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****Reitor**

Jaime Arturo Ramirez

**Vice Reitora**

Sandra Regina Goulart Almeida

**Pró Reitor de Pós Graduação**

Humberto Stumpf

**Pró Reitor de Pesquisa**

Adelina Martha dos Reis

**FACULDADE DE MEDICINA****Diretor**

Tarcizo Afonso Nunes

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL****Coordenador**

Eduardo Antônio Ferraz Coelho

**Sub – Coordenador**

Antônio Luiz Pinho Ribeiro

**Colegiado**

Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Vandack Alencar Nobre Jr.

Antônio Luiz Pinheiro Ribeiro

Denise Utsch Gonçalves

Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Unai Tupinambás

Pollyana Anício Magalhães Gontijo

Aos meus amados pais, Ercílio e Mêrces, por todo amor e pelo apoio incondicional nas minhas escolhas profissionais, hoje e sempre.

A Silvana e a Wânia por todo trabalho desenvolvido e pela amizade construída ao longo desses anos de trabalho.

A Cecília pela luz e alegria que trouxe a minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Às Professoras Silvana Spíndola de Miranda e Wânia da Silva Carvalho por todas as oportunidades, ensinamentos, apoio, amizade e por terem me ajudado a tornar uma profissional humanizada e dedicada ao controle e busca pela erradicação da tuberculose.

Ao Professor Afrânio Kritski, a professora Cláudia Vater, Suely Alves e a toda equipe do Centro de Pesquisa em Tuberculose da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela ajuda e colaboração no estudo de custo.

Ao pesquisador Philip Suffys do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada á Micobactérias do Instituto Oswaldo Cruz, pelas oportunidades abertas e colaboração.

À pesquisadora Sidra Vasconcelos por todo apoio, colaboração, ajuda, parceria e amizade que construímos ao longo do desenvolvimento do estudo de genotipagem.

Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Micobactérias, em especial à Lida, Cláudio, Nyanne e Valéria pelo companheirismo, força, cooperação e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Micobactérias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais pelo apoio e colaboração. E a Vera Lúcia por toda paciência e carinho ao longo desses anos.

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 da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, pelos ensinamentos e apoio na realização deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) e ao Centro Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro a este projeto.

Aos meus amigos e familiares pela motivação para seguir os meus sonhos.

“E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

*Cora Coralina*

## RESUMO I

No Brasil e no mundo, com o aumento dos custos da atenção à saúde houve a necessidade de avaliar os métodos de diagnóstico da tuberculose (TB) atuais a serem implantadas no Sistema Único de Saúde. O objetivo desse estudo foi avaliar o custo médio e por atividade do diagnóstico laboratorial da TB por meio de técnicas convencionais e do teste molecular Kit Detect TB<sup>®</sup>LabTest, em um Hospital Geral de alta complexidade da rede pública de saúde. O estudo do custo foi realizado por meio de dados primários, coletados no Laboratório de Pesquisa em Micobactérias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (LPM/FM/UFMG) e no Laboratório de Biologia Molecular e Saúde Pública (LBMSP) da Faculdade de Farmácia da UFMG, no ano de 2013 por duas metodologias: custo médio e custo por atividade (ABC), sendo esta uma metodologia inovadora para o serviço de saúde. Os resultados do custo médio e ABC foram de R\$ 23,50/R\$ 13,13 para baciloscopia centrifugada corado por Ziehl-Neelsen (ZN) e Auramina (AU); R\$ 17,38/R\$9,72 para baciloscopia direta corada por ZN, R\$64,09/R\$ 38,62 para Cultura em meio sólido Loweinstein- Jensen (LJ), e R\$270,84/R\$171,91 para o Kit Detect TB<sup>®</sup>LabTest. O cálculo do ABC deve ser usado na tomada de decisões pelos gestores por ser o melhor método para avaliação dos custos das técnicas convencionais e moleculares, pois fornecer o valor real dos testes. Portanto, é preciso calcular o ABC, e não o custo médio, em vários cenários antes de incorporar novas tecnologias nas instituições de saúde.



## RESUMO II

Nas últimas décadas a sublinhagem do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) RD<sup>Rio</sup> foi descrita como o genótipo predominante no Rio de Janeiro, sendo associada a família Latino - Americana – Mediterrânea (LAM) e a tuberculose multidroga resistente (TB-MDR). O objetivo deste estudo foi investigar a frequência de cepas do *M. tuberculosis* RD<sup>Rio</sup> no estado de Minas Gerais e sua relação com a tuberculose resistente. Foram selecionados, por conveniência, 223 isolados do *M. tuberculosis* sensíveis e 104 isolados TB-MDR. Os isolados são provenientes de amostras pulmonares de pacientes diagnosticados no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2011. O DNA extraído desses isolados foi analisado por meio do *Spoligotyping*; PCR-RFLP *fbpC*<sup>103</sup>/Ag85C103; PCR Multiplex RD<sup>Rio</sup> e PCR- Multiplex RD174. Foram excluídos 92 isolados (41 resistentes e 51 sensíveis) por que não amplificaram na PCR. O padrão RD<sup>Rio</sup> foi identificado em 51,91% (122/235) (I.C 0,45 – 0,58) dos isolados, seguido de 100/235 (42,5%) padrão selvagem e 13/235 (5,53%) padrão misto. Dos 63 *M. tuberculosis* resistentes 41/63 (65.1%) e 81/172 (47,1%) sensíveis apresentaram padrão RD<sup>Rio</sup> ( $p = 0,001$ ) e o marcador RD174 foi mais frequente nas sensíveis ( $p = 0,001$ ). A sublinhagem RD<sup>Rio</sup> foi mais frequente na TB-MDR, nos isolados sensíveis o marcador RD174 predominou, a família LAM e a linhagem LAM9 foram as mais identificadas. Novos estudos para avaliar a virulência e transmissão da TB devem ser realizados no Brasil, assim como novos estudos para acompanhar a evolução genética do *M. tuberculosis*.

## ABSTRACT I

**Background:** At a global level, with the increase in healthcare costs, there is a need to assess the economic impact of the incorporation of new technologies in different health disorders in different countries. There is scarce information regarding costs incurred with the use of current or new diagnostic tests for tuberculosis or from the vantage point of their incorporation within the healthcare systems of high-burden countries.

The present study aimed to assess the mean cost and the activity based cost of the laboratory diagnosis for tuberculosis by means of conventional techniques and from the Detect TB<sup>®</sup>LabTest molecular test kit in a general high-complexity hospital of the public health system in Brazil. **Methods:** Cost analysis was performed by means of primary data, collected in the Mycobacteria and Molecular Biology Laboratory in 2013.

**Results:** The mean cost and activity based cost were, respectively, U\$10.06/U\$5.61 for centrifuged bacilloscopy by Ziehl Neelsen and Auramine; U\$7.42/U\$4.15 for direct bacilloscopy by Ziehl Neelsen; U\$27.38/U\$16.50 for culture in a Lowenstein-Jensen solid medium; and U\$115.74/U\$73.46 for the Detect TB<sup>®</sup>LabTest Kit. **Conclusions:** The calculation of the ABC should be used in making decisions by administrators to be the best method of assessing the costs of conventional techniques and molecular method for providing the real value of the tests. So it is need to calculate the ABC, and not of the mean cost, in various scenarios before incorporating new technologies in health institutions.

## ABSTRACT II

In the last decades the sublineage of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) RD<sup>Rio</sup> was described as the predominant genotype in Rio de Janeiro, being associated with Latin American-Mediterranean family (LAM) and multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). The objective of this study was to investigate the frequency of *M. tuberculosis* RD<sup>Rio</sup> strains in the State of Minas Gerais and its relationship with resistant tuberculosis. For convenience, 223 susceptible *M. tuberculosis* isolates and 104 MDR-TB isolates were selected. The isolates from sputum samples of patients diagnosed from January 2007 to December 2011. DNA extracted was analyzed by Spoligotyping; PCR-RFLP *fbpC103* / Ag85C103; PCR Multiplex RD<sup>Rio</sup> and PCR-Multiplex RD174. The RD<sup>Rio</sup> pattern was identified in 51.91% (122/235) (I.C. 0.45 - 0.58) of the isolates, followed wild-type 100/235 (42.5%) and 13/235 (5.53%) mixed pattern. 92 isolates (41 resistant and 51 sensitive) were excluded because they did not amplify in the PCR. Of the 63 *M. tuberculosis* resistant 41/63 (65.1%) and 81/172 (47.1%) sensitive had RD<sup>Rio</sup> pattern ( $p = 0.001$ ) and the RD174 marker was more frequent in the sensitive ( $p = 0.001$ ). The RD<sup>Rio</sup> sublineage was more frequent in MDR-TB, in the sensitive isolates the RD174 marker predominated, the LAM family and the LAM9 lineage were the most identified. New studies to evaluate the virulence and transmission of TB should be carried out in Brazil, as well as monitoring the genetic evolution of *M. tuberculosis*.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABC *Activity Based Cost* ou custo por atividade

AU Auramina O

CMTB Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

CTAB Brometo de Cetil Trimetilamonio

DNA Ácido Desoxirribonucléico

dNTP Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA Àcido Etilenodiamino Tetra-Acético

EPI Equipamento de Proteção Individual

E Etambutol

FAFAR Faculdade de Farmácia

FM Faculdade de Medicina

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

H Isoniazida

I Isoniazida

LAM *Latin American- Mediterranean* ou Latino - Americana – Mediterrânea

LJ Lowestein-Jessen

LPM Laboratório de Pesquisa em Micobactérias

LBMSP Laboratório de Biologia Molecular e Saúde Pública

MC *Mean Cost* ou customédio

MG Minas Gerais

MNT Micobactérias Não Tuberculosas

MIRU *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*

MDR Multidroga resistente

*M. tuberculosis Mycobacterium tuberculosis*

NALC N -Acetyl L-Cisteína

OMS Organização Mundial de Saúde

PNB Ácido Paranitrobenzóico

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

R Rifampicina

RD regiões de locus diferentes

RFLP *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SDS Duodecilsulfato de Sódio

SNPs Polimorfismos de nucleotídeo único

SUS Sistema Único de Saúde

TB Tuberculose

TCH Ácido 2-tiofenocarboxílico

TBE Tris Borato EDTA

TE Tris EDTA

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

UFRJ Universidade Federal do Rio de Janeiro

VNTR *Variable numbers tandem repeats*

ZN Ziehl Neelsen

**LISTA DE TABELAS**

TABLE 1. Cost of infrastructure of Research Laboratory in Mycobacteria and Molecular Biology and Public Health Laboratory, FUMG

TABLE 2. Solid Culture on Loweinsten-Jensen - Main cost elements

TABLE 3. Cost of the main equipment and inputs for bacilloscopy

TABLE 4. Main laboratory issued with impact on Detect TB<sup>®</sup> test costs

TABLE 5. Mean and Activity Based Cost from the Research Laboratory in Mycobacteria and Molecular Biology and Public Health Laboratory, FUMG

TABLE 6. Cost components of Activity Based Cost for each diagnostic test

Tabela 1. Perfil genotípico do *M. tuberculosis* RD<sup>Rio</sup>

Tabela 2. Classificação das Linhagens do *M. tuberculosis* em Minas Gerais

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Fórmula do Custo Médio e ABC

FIGURE 2 – Cost Flow in the Activity Based Costing systems

## SUMÁRIO

1.0 CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	16
1.1.1 Estudo do Custo do diagnóstico laboratorial da tuberculose.....	16
1.1.2 Estudo de Genotipagem do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	18
1.2 JUSTIFICATIVA .....	20
1.2.1 Estudo do Custo do diagnóstico laboratorial da tuberculose.....	20
1.2.2 Estudo de Genotipagem do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	20
2.0 OBJETIVO DO ESTUDO DO CUSTO DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TUBERCULOSE.....	21
2.0.1 Objetivo geral .....	21
2.0.2 Objetivos específicos.....	21
2.1 OBJETIVO DO ESTUDO DE GENOTIPAGEM DO <i>M. TUBERCULOSIS</i> .....	21
2.1.1 Objetivo geral .....	21
2.1.2 Objetivos específicos.....	21
3.0 METODOLOGIA .....	22
3.1 Metodologia do Estudo do Custo do diagnóstico laboratorial da tuberculose .....	22
3.2 Metodologia do Estudo de Genotipagem do <i>M. tuberculosis</i> .....	27
3.3 Aspectos éticos .....	33
4.0 NOTA EXPLICATIVA.....	34
4.1 Artigo 1 – 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 .....	35
4.1 Artigo 2 – <i>Mycobacterium tuberculosis</i> RD <sup>Rio</sup> na tuberculose resistente em Minas Gerais, Brasil .....	42
5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	59
6.0 PERSPECTIVAS .....	60
6.1 Estudo do Custo do Diagnóstico Laboratorial da TB.....	60
6.2 Estudo da Genotipagem do <i>M. tuberculosis</i> .....	60
7.0 REFERÊNCIAS .....	61
8.0 ANEXOS .....	65
8.1 Anexo A – Folha de Aprovação no Comitê de Ética – Estudo de Custo .....	65
8.2 Anexo B – Folha de Aprovação no Comitê de Ética – Estudo de Genotipagem .....	66
8.3 Anexo C – Folha de Aprovação da Defesa .....	67



## 1.0 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1.1.1 Estudo do Custo do diagnóstico laboratorial da tuberculose

A tuberculose (TB) continua sendo das doenças transmissíveis a que mais mata no mundo. Em 2015 a Organização Mundial de Saúde (OMS), estimou que 10.4 milhões pessoas desenvolveram tuberculose, dentre esses 480.000 eram casos de TB multidroga resistente (TBMDR; resistência do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) a pelo menos isoniazida e rifampicina) e 1.2 milhões (12%) eram HIV-positivos (WHO, 2016).

Em 2015, foram notificados 75.526 casos de TB no Brasil, sendo 63.189 casos novos, 12.337 casos de retratamento (16,3%) e dentre esses 1.027 TBMDR. O coeficiente de incidência de TB no país atualmente é de 38,7/100 mil habitantes, em Minas Gerais de 15,1/100 mil habitantes e em Belo Horizonte de 21,3/100 mil habitantes (BRASIL, 2016).

Um fator determinante para o surgimento de novos casos é o tempo durante o qual o paciente portador de TB pulmonar mantém a cadeia de transmissibilidade. Em 2015, a proporção de realização de cultura de escarro nos casos novos de tuberculose pulmonar foi de 23,1% (WHO, 2015; MS 2016).

Assim, o desenvolvimento e principalmente a implantação de testes diagnósticos de qualidade, rápidos, sensíveis e custo efetivos associados a critérios clínicos, epidemiológicos e radiológicos são estratégias eficazes para o controle da TB (Dye *et al.*, 2002; Nagdev *et al.*, 2010; BRASIL, 2010).

Nesse contexto a OMS endossou o uso de métodos moleculares para detecção da TB e TB resistente, como alternativa para o diagnóstico mais rápido da doença (Shah *et al.*, 2013). Estes métodos apresentam alta especificidade, embora alguns demonstrem uma sensibilidade variável especialmente em pacientes com baciloscopia negativa. A maior vantagem destes métodos é que eles podem fornecer resultados bem mais rápidos que a cultura, e a grande desvantagem é que são caros e complexos para uso na rotina em contextos de recursos limitados (Steingart *et al.*, 2015).

Os métodos moleculares comerciais mais utilizados para a detecção da TB e TB resistente são o GenoType<sup>®</sup>MTBDRplus (Biomeuriéx) e o Xpert MTB/RIF<sup>®</sup> (Cepheid), esse último, foi implementado no Sistema Único de Saúde do Brasil (SUS) por recomendação do Ministério da Saúde. Além da implementação do Xpert MTB/RIF<sup>®</sup>, foi desenvolvido no Brasil o Kit Detect TB<sup>®</sup> LabTest<sup>®</sup>, que trata-se de um método molecular que detecta o produto amplificado por hibridização em placa por meio de uma reação colorimétrica com a

finalidade do diagnóstico molecular do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) diretamente de amostras respiratórias (BRASIL, 2011; Michelon *et al.*, 2011; Schimid *et al.*, 2014). Apesar do desenvolvimento dos testes moleculares são escassos os dados acerca de tais custos, e os programas de controle da TB exigem tomadas de decisões baseadas em algoritmos de diagnósticos que devem considerar os custos laboratoriais, associados ao tratamento clínico e a prevalência local da TB (Steingart *et al.*, 2015). As análises econômicas na área da saúde encontram-se em cenário de muitas premissas, pois informações necessárias para a construção dessas análises não estão facilmente disponíveis o que leva a necessidade permanente da utilização de modelos econômicos. Os gestores dos sistemas de saúde enfrentam desafios constantes devido ao crescimento tecnológico e o aumento proporcional que este crescimento causa nos gastos de saúde. Neste contexto a economia da saúde está cada vez mais incorporada nos processos de tomadas de decisão pelos gestores (Laranjeira & Petramale, 2009).

No âmbito do diagnóstico laboratorial da TB, mesmo com o desenvolvimento dos métodos moleculares e implementação do Xpert MTB/RIF<sup>®</sup>, a maioria dos laboratórios no Brasil está estruturada para realizar somente baciloscopia e cultura para micobactérias, portanto, torna-se necessário realizar estudos de custos para mensurar os custos reais dos testes diagnósticos no SUS, ressaltando o Kit Detect TB<sup>®</sup> por ser o único método molecular nacional (BRASIL, 2010; Michelon *et al.*, 2011).

### 1.1.2 Estudo de Genotipagem do *Mycobacterium tuberculosis*

O estudo da epidemiologia molecular do *M. tuberculosis* é importante demanda da saúde global (WHO, 2010).

Um paradigma da biologia evolutiva do CMTB postula que a diversidade genética e biológica em suas espécies e sublinhagens decorrem principalmente de alterações genômicas brutas, tais como: deleções, inserções, inversões e duplicações, as quais são conhecidas como regiões de locus diferentes (RD) (Lazzarini *et al.*, 2007).

As estirpes do Complexo MTB partilham altas semelhanças genômicas, porém o desenvolvimento de vários métodos de genotipagem lançaram uma nova visão sobre a biologia do patógeno e suas diversidades genéticas, sugerindo inclusive que a tendência para adquirir resistência os fármacos pode ser influenciado pela origem genética da estirpe (Bifani *et al.*, 2002; Yeboah-Manu *et al.*, 2011). Essas diversidades genéticas refletem em uma biodiversidade entre os bacilos da TB no que diz respeito à filogenia, virulência, transmissibilidade, mecanismos de reativação da doença assim como o grau de re-infecção exógena resistência a fármacos e capacidade de induzir respostas imunológicas (Gibson *et al.*, 2008; Yeboah-Manu *et al.*, 2011). Alguns métodos moleculares que têm sido empregados para a genotipagem do CMBT tais como: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Spoligotyping* (que detecta a variabilidade do locus), *Variable Number Tandem Repeats* (VNTR) e *Large Sequence Polymorphism* (LSP) (Van Embden *et al.*, 1993; Supply *et al.*, 2006; Sola *et al.*, 2003). Esses métodos são capazes de revelar diferenças nas distribuições geográficas e preferência hospedeira aparente de linhagens filogenéticas distintas do CMBT (Vasconcelos *et al.*, 2014; Yeboah-Manu *et al.*, 2011).

Dentre as linhagens do *M. tuberculosis* a família LAM (Latino - Americana – Mediterrânea) é apontada como a de maior prevalência, sendo contabilizados 15% da carga global de TB. Foi descrito no Rio de Janeiro, um clone originado de um ancestral comum desta família, proveniente da linhagem LAM9 e denominado *M. tuberculosis* RD<sup>Rio</sup>. Nesse mesmo estudo foi sugerido o potencial desse genótipo de causar TB primária progressiva com evolução para um fenótipo de multirresistência (Lazzarini *et al.*, 2007).

O conhecimento da filogenética das cepas responsáveis por estas infecções, a investigação a frequência do isolamento do *M. tuberculosis* RD<sup>Rio</sup> e sua relação com fenótipos e genótipos de perfis de resistência aos fármacos de primeira linha são importantes para o tratamento da tuberculose e para o conhecimento da epidemiologia molecular da TB.

Dentro da perspectiva da saúde pública, estudos de genotipagem do *M. tuberculosis* contribuem efetivamente para o entendimento da TB com repercursões sobre características clínicas de genótipos predominantes ou emergentes, suas associações epidemiológicas com focos da doença, vias de transmissão e resistência a fármacos, no Brasil e em muitas partes do mundo (David *et al.*, 2012; Lazzarini *et al.*, 2007).

## 1.2 JUSTIFICATIVA

### 1.2.1 Estudo do Custo do diagnóstico laboratorial da tuberculose

O diagnóstico laboratorial da TB é imprescindível para estabelecer e monitorar o tratamento correto, além de romper a cadeia de transmissão da doença. A introdução dos métodos moleculares na rotina pode ser uma ferramenta importante para aumentar a acurácia do diagnóstico. Portanto a realização de um estudo do custo laboratorial das metodologias micobacteriológicas e moleculares é de extrema importância para avaliar o real impacto econômico da manutenção de um laboratório de nível de biossegurança 3 (B3) devidamente estruturado, para realizar ambas metodologias.

A realização do estudo de custo do diagnóstico por meio de diferentes metodologias proporciona um resultado fidedigno dos custos das tecnologias avaliadas por abranger diferentes parâmetros em um mesmo estudo.

### 1.2.2 Estudo de Genotipagem do *M. tuberculosis*

A identificação filogenética das cepas do *M. tuberculosis* é de fundamental importância para compreender aspectos relacionados á prevalência da infecção em determinada população, mecanismos de virulência, transmissibilidade, aquisição de resistência a fármacos, e capacidade de gerar ou inibir respostas imunológicas.

A investigação da frequência do isolamento do *M. tuberculosis* RD<sup>Rio</sup> em Minas Gerais é relevante para conhecer o perfil genotípico das cepas isoladas no estado sua associação com formas graves da TB.

## **2.0 OBJETIVO DO ESTUDO DO CUSTO DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TUBERCULOSE**

### 2.0.1 Objetivo Geral

Analisar o custo do diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar

### 2.0.2 Objetivos específicos

Realizar:

estudo do custo médio e por atividade das metodologias micobacteriológicas e moleculares realizadas na rotina do Laboratório de Pesquisa em Micobactérias da Faculdade de Medicina da UFMG – LPM/FM/UFMG.

estudo do custo do diagnóstico laboratorial ao associar duas ou mais metodologias por amostra.

## **2.1 OBJETIVO DO ESTUDO DE GENOTIPAGEM DO *M. TUBERCULOSIS***

### 2.1.1 Objetivo geral

Investigar a frequência de cepas do *M. tuberculosis* da sublinhagem RD<sup>Rio</sup> em Minas Gerais

### 2.1.2 Objetivos específicos

Avaliar a frequência:

das cepas da sublinhagem RD<sup>Rio</sup> dentre as cepas resistentes e sensíveis por meio do PCR multiplex e RD174.

da família LAM.

### 3.0 METODOLOGIA

#### 3.1 Metodologia do Estudo do Custo do diagnóstico laboratorial da TB

##### 3.1.1 Delineamento

A análise de custos foi baseada na rotina de funcionamento LPM/FM/UFMG e do Laboratório de Biologia Molecular e Saúde Pública (LBMSP) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da UFMG. Foram coletados dados referentes aos componentes de custo das metodologias realizadas nos laboratórios durante 2013.

##### 3.1.2 Rotina de Funcionamento do LPM/FM/UFMG

Neste laboratório existem dois fluxos de trabalho para a baciloscopia: 1) baciloscopia direta pelo *Ziehl Neelsen* (ZN) em amostras respiratórias provenientes dos setores de pronto atendimento e enfermarias do Hospital das Clínicas da UFMG (HC/UFMG) para liberação do resultado em até 4 horas. 2) baciloscopia centrifugada para a realização da coloração pelo método de ZN e fluorescência Auramina “O” (AU) de todas as demais amostras que chegam do Complexo Hospitalar (ambulatórios), inclusive das amostras em que foram realizadas a baciloscopia direta.

A cultura é realizada em meio sólido *Loweinstein- Jensen* (LJ), utilizando quatro tubos, sendo: dois tubos sem fármacos e um contendo Ácido Paranitrobenzóico (PNB) e um contendo Ácido 2-tiofenocarboxílico (TCH). As amostras são descontaminadas pelo método N -Acetyl L-Cisteína (NALC). (WHO, 2009).

Para o cálculo dos custos do Kit Detect TB<sup>®</sup> foi considerado somente as amostras respiratórias devido a recomendação do fabricante (LABTEST, 2012), além de todas as condições do LPM/FM/UFMG e do Laboratório de Biologia Molecular e Saúde Pública da Faculdade de Farmácia da UFMG.

##### 3.1.3 Casuística

Foram analisadas em 2013, 1482 amostras pulmonares e extrapulmonares, provenientes de 817 pacientes, no LPM/FM/UFMG, constituídas por 712 escarros, 70 Lavados Bronco Alveolares (BAL), 362 líquores, 48 urinas, e o restante das amostras divididas entre demais secreções e líquidos corporais, sangue e material de biópsia. Foram realizadas por mês em média: 100 baciloscopias, 91 culturas e 40 testes moleculares.

### 3.1.4 Coleta de dados gerais do LPM/FM/UFMG e LBMS

Para a construção da cadeia de custos foram coletados os seguintes dados em relação a infra estrutura e recursos humanos:

Valor do contrato anual de manutenção do Laboratório NB3 e da conta mensal de luz, de água e telefone dos prédios.

Valor do contrato mensal da empresa de segurança e de limpeza.

O consumo de energia, água e telefone, assim como a demanda referente aos serviços de limpeza e segurança foi de 0,20% sob o valor total desses itens. Essa porcentagem de 0,20% corresponde ao consumo médio do laboratório em relação ao consumo total do prédio referente a esses serviços. Estes valores foram incorporados aos cálculos de custo em cada metodologia.

#### Coleta de informações gerais e dos Componentes de Custo das Metodologias Laboratoriais

Para a construção da cadeia de custos das metodologias avaliadas foram coletados dados específicos de cada metodologia referentes aos: valores de compra dos equipamentos e materiais de consumo permanente, insumos e salário dos recursos humanos. Para todos esses itens foram consideradas todas as etapas de realização de cada técnica incluindo as fases pré analítica (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) em relação ao número de vezes utilizados na rotina.

Foram coletados também para cada metodologia as seguintes informações: número de exames realizados mensalmente, tempo médio para realização de um exame, número de técnicos, bioquímicos, agentes administrativos envolvidos nas atividades e sua respectiva dedicação média por exame em relação a carga horária total de trabalho.

Itens avaliados por exame:

- Baciloscopia direta corada por ZN:

Equipamentos e materiais de consumo permanente: microscópio binocular, cabine de segurança biológica, bico de Bunsen, cronômetro, bancada com água corrente, suporte



para corar lâminas, frascos de vidro 200mL, pinça anatômica, haste de metal, estante para tubos para secar lâminas, funil de vidro para filtrar corantes, balcão, geladeira de armazenamento, *no break*, freezer -20°C, caixa porta lâmina, higienizador para mãos, cestas de lixo, telefone e computador.

Recursos Humanos: Técnico de Laboratório, Agente administrativo, funcionários de segurança e limpeza.

Insumos: a) reagentes em litros: álcool à 70%, fenol à 5%, fucsina fenicada a 0,3%, solução descorante de álcool ácido à 3%, azul de metileno a 0,3% e óleo de imersão.

b) materiais em unidade: rolo de papel absorvente, lâminas de vidro, caixa de papelão para descarte de material, saco plástico autoclavável, fita adesiva, lápis, caneta esferográfica, fósforo, gaze. c) equipamentos de proteção individual: máscara N95 NIOSHI, avental descartável e luvas.

- Baciloscopia centrifugada corada por ZN e AU

Equipamentos e materiais de consumo permanente: microscópio binocular, Microscópio de fluorescência, centrífuga refrigerada, cabine de segurança biológica, bico de Bunsen, cronômetro, bancada com água corrente, suporte para corar lâminas, frascos de vidro 200mL, pinça anatômica, haste de metal, estante para tubos para secar lâminas, estante pra tubos Falcon, funil de vidro pra filtrar corantes, balcão, geladeira de armazenamento, agitador (vortéx), *no break*, freezer -20°C, caixa porta lâmina, higienizador para mãos, cestas de lixo, telefone e computador.

Recursos Humanos: Bioquímico, Técnico de Laboratório, Agente administrativo, e funcionários da segurança e limpeza.

Insumos: a) reagentes em litros: álcool à 70%, fenol à 5%, fucsina fenicada a 0,3%, solução descorante de álcool ácido à 3%, azul de metileno a 0,3%, óleo de imersão, solução de auramina “O”, solução descorante de álcool ácido à 1%, solução de permanganato de potássio, solução NaOH 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 Falcon 50mL, saco plástico autoclavável, fita adesiva, lápis, caneta esferográfica, fósforo, gaze. c) equipamentos de proteção individual: máscara N95 NIOSHI , avental descartável e 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 200mL para descarte de material, estante para tubos de ensaio, bandeja de polipropileno pra incubação dos meios semeados, agitador (vortéx), estante para tubos de Falcon, balcão, pia, geladeira de armazenamento, *no break*, freezer -20°C, higienizador para mãos, cestas de lixo, telefone e computador.

Recursos Humanos: Bioquímico, Técnico de Laboratório, Agente administrativo, funcionários da 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 Falcon 50mL, saco plástico autoclavável, lápis, caneta esferográfica, gaze. c) equipamentos de proteção individual: máscara N95 NIOSHI, avental descartável e luvas.

- Kit Detect TB<sup>®</sup>

Equipamentos e materiais de consumo permanente: microcentrífuga, cabine de segurança biológica, cronômetro, agitador (vortéx), purificador de água MiliQ, espectrofotômetro, forno de hibridação, termociclador, termobloco, pipeta multicanal, pipetas automáticas de 2µL, 20 µL, 200 µL e 1000 µL, frascos de vidro de 200mL para descarte de material, balcão, pia, geladeira de armazenamento, *no break*, freezer -20°C, higienizador para mãos, cestas de lixo, telefone e computador.

Recursos Humanos: Bioquímico, Agente administrativo, funcionários da segurança e limpeza.

Insumos: a) reagentes em litros: álcool à 70%, solução de hipoclorito a 1%, Kit Detect TB<sup>®</sup> Labtest<sup>®</sup>

b) materiais em unidade: rolo de papel absorvente, caixa de papelão para descarte de material, microtubos de 200 µL, microtubos de 2000 µL, ponteiros com filtro de 20 µL, 200 µL e 1000 µL c) equipamentos de proteção individual: máscara N95 NIOSHI, avental descartável e luvas.

### 3.1.5 Análise do Custo Médio e Custo por Atividade (ABC)

Os custos do diagnóstico laboratorial da TB (baciloscopia e cultura) 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/UFMG.

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).

As fórmulas utilizadas para construção da cadeia de cálculo dos custos estão exemplificadas da Figura 1.

Figura 1 – Fórmula do Custo Médio e ABC

<p>Custo médio</p> $\sum_{i=1}^{i=n} \frac{(p_i q_i d_i)}{A}$	<p>Custo por atividade</p> $\sum_{i=1}^{i=n} P_i q_i c t$
---	---

$P_i$  = 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

## 3.2 Metodologia do Estudo de Genotipagem do *M. tuberculosis*

### 3.2.1 Delineamento

Estudo descritivo da avaliação genética do *M. tuberculosis* resistente e sensível em cepas do estado de Minas Gerais e investigação da frequência linhagem RD<sup>Rio</sup>.

### 3.2.2 Casuística

#### *Desenho do estudo*

Foram selecionadas por conveniência, 104 *M. tuberculosis* resistentes e 223 sensíveis, provenientes de amostras pulmonares do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais (LACEN-MG) – Instituto Octávio Magalhães - Fundação Ezequiel Dias (FUNED), no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2011.

### 3.2.3 Critérios de Inclusão

Cepas do *Mycobacterium tuberculosis* estocadas a -70°C no LPM/FM/UFMG no período de 2007 a 2013, provenientes de pacientes do estado de MG.

### 3.2.4 Critérios de Exclusão

Micobactéria Não Tuberculosa (MNT).

### 3.2.5 Isolamento Micobacteriano

As cepas estocadas provenientes de amostras clínicas pulmonares foram previamente processadas, identificadas e testadas quanto a sensibilidade aos fármacos de primeira linha para o tratamento da TB: estreptomicina (S), isoniazida (I), rifampicina (R) e etambutol (E) por meio do método BACTEC<sup>®</sup> MGIT 960<sup>®</sup> (Siddiqi & Rüsç-Gerdes, 2006).

### 3.2.6 Extração de DNA

Para a extração do DNA foram retiradas duas alçadas do crescimento micobacteriano em *Lowenstein Jensein* (LJ) e transferidos para um microtubo contendo 515 µL de tampão Tris-ácido etilenodiaminotetracético (TE). A inativação bacteriana foi realizada por aquecimento por 30 minutos a 80°C em termobloco. Em seguida foi adicionado 64µL da suspensão de lisozima 10 mg/mL e o material foi incubado a 37°C por uma hora. Após este procedimento foi adicionado 97µL da solução (1400 µL Duodecil Sulfato de Sódio - SDS a 10% e 400 µL de proteinase K) e incubado a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 128 µL de NaCl 5M com 128 µL de brometo cetiltrimetilamônio (CTAB) previamente aquecidos e o tubo de reação foi homogeneizado no vórtex até se obter uma mistura branca leitosa e incubado em termobloco a 65°C por 10 minutos. Em seguida foram adicionados 1030 µL de clorofórmio/álcool-isoamil (24:1), homogeneizado e centrifugado a 12.000 rotações por minuto (rpm) a 4°C por 8 minutos. Aproximadamente 600µL da fase aquosa foram transferidos para um microtubo limpo e em seguida adicionou-se 0,6 do volume de isopropanol padrão analítico (P.A), misturado por inversão e incubado por 12 horas a -20°C. Após esse período o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado deixando 20 µL aproximadamente no pellet. O sedimento foi lavado novamente com 1000 µL de etanol 70% previamente resfriado. Centrifugado por 5 minutos e repetindo o mesmo procedimento para descartar o etanol 70%. Após este procedimento os tubos foram centrifugados novamente por um minuto e invertidos em papel absorvente para descarte do restante do sobrenadante. Após esse procedimento, foram centrifugados por 5 minutos a 65°C no concentrador a vácuo eppendorf<sup>®</sup>. Foram adicionados aproximadamente 60-100 µL de tampão TE, de acordo com o tamanho o pellet visível. Após a adição do TE os DNA foram armazenados por

24 horas em geladeira (2-8°C) e posteriormente armazenados a -20°C (Dantas *et al.*, 2015).

### 3.2.7 Verificação da presença de DNA extraído

As amostras de DNA foram processadas no LBMSP/UFMG, onde foi preparado um gel de agarose a 1% em TBE, adicionado 5 µL de DNA extraído em cada canaleta e realizada corrida a 120 Volts por 45 minutos para verificar presença de bandas. Os DNA foram também dosados em espectrofotômetro utilizando-se 1 µL de cada amostra.

### 3.2.8 PCR Multiplex RD<sup>Rio</sup>

A detecção do perfil RD<sup>Rio</sup> foi realizada por meio do seguinte protocolo do PCR multiplex. Para a mistura de PCR foi utilizado, 20 pmol/µL de cada iniciador: BridgeRD<sup>Rio</sup>F 5' CAC TCC GGC TGC CAA TCT CGT C 3'; BridgeRD<sup>Rio</sup>R 5' CAC CGC CAC GCT GAA TGA GAC CA 3'; IS1561F 5' GAC CTG ACG CCG CTG ACA C 3' e IS161R 5' CAC CTA CAC CGC TTC CTG CC 3' em um volume final de 50 µl contendo 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 1U Taq DNA polimerase (Phoneutra<sup>®</sup>), 1X *buffer*, 10% Dimetilsulfóxido (DMSO) e 10 ng de DNA. As amplificações foram realizadas com o seguinte ciclo: 5 min a 95 °C seguido de 45 ciclos de 1 min á 95°C, 1 min á 60°C, 4 min á 72°C e uma extensão final á 72 °C por 10 min em termociclador Veriti 96 WellThermocycler (AppliedBiosystems<sup>®</sup>). Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X corados com brometo de etídio (1 µg/mL), observando a presença ou ausência de fragmentos de 1175 e/ou 530 pares de base (pb). O padrão RD<sup>Rio</sup> apresenta o fragmento de 1175pb, e o padrão selvagem o fragmento de 530 pb, e em caso de aparecimento de ambos os fragmentos trata-se de um padrão misto (Lazzarini *et al.*, 2007).

### 3.2.9 PCR-RFLP *fbpC*<sup>103</sup>/Ag85C103

O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) *fbpC*<sup>103</sup> ou Ag85C103 foi descrito como marcador específico para a linhagem LAM por Gibson *et al.*, 2008. A PCR foi adaptada e descrita por Vasconcelos *et al.*, 2014. Para a amplificação foram utilizados 40 pmol/μL de cada um dos iniciadores, *fbpC*103 F: 5' CTG GCC GTT GCT CTG CGA GGG CTGATA CCA '3 e *fbpC*103 R: 5'-CGA TCT CGC GCT GCG GCC ACG ACA TT-'3 em reações contendo: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTPs, 1U Taq DNA polimerase (Phoneutra<sup>®</sup>), *buffer* 1X, 10% DMSO e 10 ng de DNA, em um volume final de 50 μL. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial de 5min a 95°C seguido por 45 ciclos de 1 min 95°C, 1 min 60°C, 4 min 72°C e extensão final de 10 min 72°C em termociclador Vereti 96 WellThermocycler (AppliedBiosystems<sup>®</sup>). Os produtos amplificados (519 bp) foram analisados em gel de Agarose 2% em TBE 1X e corados com brometo de etídio (1 μg/mL), 15μL do produto amplificado foram submetidos à digestão enzimática com 1U da enzima de restrição MnlI a 37°C por 4 horas (New EnglandBioLabs Inc. USA) seguindo as recomendações do fabricante. A enzima MnlI apresenta três fragmentos no produto amplificado: 365pb, 96 pb e 48 pb. A presença do SNP (G309A) resulta na perda de um dos três sítios de restrição, o que permite a detecção da variante mutante. Após a digestão enzimática 15 μL da reação foi submetida à eletroforese em gel de Agarose 3% (TBE 1X) e corados com brometo de etídio (1 μg/mL). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados comparando com marcadores moleculares de 50 pares de base (pb) e 100 pb (Fermentas<sup>®</sup>). A variante mutante (LAM) foi caracterizada pela presença de duas bandas de 461 pb e 48 pb e o selvagem por bandas (Não LAM) de 365 pb, 96 pb e 48 pb.

### 3.2.10 PCR- Multiplex RD174

Para a amplificação foram utilizados 40 pmol/ $\mu$ L de cada um dos 3 iniciadores a seguir: RD174 F: 5'AGC TGC TCC GGCTCG CGG TCC TCG TTG TC '3, RD174Fi: 5'-GCC TAT CCG CGG ACG GCA TCCATT GTG A-'3 e RD174 R: 5'-ATC GCA GCG GTG AAC GTT TCG ACG GCA TCT-'3 em uma reação contendo: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 1U Taq DNA polimerase (Phoneutra<sup>®</sup>), *buffer* 1X e 10 ng de DNA, em um volume final de 50  $\mu$ L. As amplificações foram realizadas com as seguintes condições: Desnaturação inicial de 5 min. a 95°C seguido por 45 ciclos de 1 min 95°C, 1 min 60°C, 4 min 72°C e extensão final de 10 min 72°C em termociclador Vereti 96 Thermal Cycler (Applied Biosystems<sup>®</sup>). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) e coloração do DNA com brometo de etídio (1 $\mu$ g/mL). Para determinação dos fragmentos amplificados pela PCR, 5 $\mu$ L do produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de Agarose 2% (TBE 1X) e corados com brometo de etídio (1  $\mu$ g/mL). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados comparando com marcadores moleculares de 50 pares de base (pb) e 100pb (Fermentas<sup>®</sup>). Os isolados que apresentam a região RD174 intacta, apresentam fragmentos de 300 pb e os que possuem a deleção apresentam fragmentos de 500pb (Gibson *et al.*, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2014).

### 3.2.11 Spoligotyping

O *Spoligotyping* foi realizado por meio da técnica da hibridização em microesferas (beads) desenvolvida no Laboratório de Infecção, Genética e Patógenos emergentes do Instituto de Genética e Microbiologia da Universidade Paris Sud, França e descrito por Zhang *et al.* 2010. Para as amplificações foram utilizados 10 pmol/ $\mu$ L de cada iniciador: Dra 5'CCG AGA GGG GC GGA AAC 3'e DRb 5'GGT TTT GGG TCT GAC GAC 3'sendo este marcado com biotina na extremidade 5' em uma reação contendo: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 1U Taq DNA polimerase (Phoneutra<sup>®</sup>), *buffer* 1X e 10 ng de DNA, em um volume final de 50 $\mu$ L. As amplificações foram realizadas com as seguintes condições: Desnaturação inicial de 3 min. a 96°C seguido por 30 ciclos de 1 min 96°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C e extensão final de 10 min 72°C em termociclador Vereti 96 Thermal Cycler (Applied Biosystems<sup>®</sup>). Após amplificação 5 $\mu$ L do DNA amplificado é adicionado a solução de hibridização (1,55  $\mu$ L de microesferas



Beamedex<sup>®</sup> + 31,5µL de TMAC 1,5X) submetidos ao termociclador com desnaturação a 95°C por 10 min e hibridização a 52°C por 20 min. Após a hibridização a microplaca foi centrifugada a 4000 rpm/4°C por 7 minutos. Após centrifugação retira-se 40 µL do sobrenadante e ressuspende em 40 µL de TE. Adiciona-se então 25 µL da solução de Estreptavidina-R-Ficoeritrina 1mg/µL (Invitrogen<sup>®</sup>) e analisados por meio do sistema Luminex<sup>®</sup>Bioplex<sup>®</sup>BioRad<sup>®</sup>. Parte das análises do *Spoligotyping* foram previamente realizados na tese da Dra. Nyanne Gama Teixeira Dantas (Dantas, 2015).

### 3.2.12 Análise dos dados

Os cálculos foram realizados por meio dos programas STATA versão 12 Copyright 1985-2015 StataCorpLP<sup>®</sup>USA, e pelo site livre SITIVITwebsite [http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT\\_ONLINE/](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/).

### 3.3 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG sob o parecer 122.941 (CAAE 06611912.8.0000.5149) como parte do projeto intitulado “Avaliação da Concentração inibitória mínima (MIC) de cepas do *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e resistentes isoladas em Minas Gerais” sendo autorizado a utilização das cepas para estudo genético.

#### 4.0 NOTA EXPLICATIVA

Seguindo as orientações do Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical os resultados e discussões serão apresentados em formato de artigo. Como pré-requisito para a defesa da tese de doutorado esta deve conter pelo menos um artigo submetido e um artigo a ser submetido para revista indexada *pelo Journal Citation Reports* (JCR) e classificada no WebQualis Periódicos da área Medicina II como A1 ou A2.

O Artigo referente ao estudo do custo do diagnóstico da tuberculose foi aceito para publicação na revista *Frontiers in Microbiology* (Fator de impacto em 2016 de 4.165 e classificada como Qualis A2/ Medicina II) entitulado: 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.

O Artigo 2 referente ao estudo da genotipagem do *M. tuberculosis* será submetido a revista *Tuberculosis* (Fator de impacto em 2016 de 3.394 e classificada como Qualis A2/ Medicina II) entitulado: *Mycobacterium tuberculosis* RD<sup>Rio</sup> na tuberculose resistente em Minas Gerais, Brasil.



# 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

Isabela N. de Almeida<sup>1</sup>, Lida J. de Assis Figueredo<sup>1</sup>, Valéria M. Soares<sup>1</sup>, Maria C. Vater<sup>2</sup>, Suely Alves<sup>2</sup>, Wânia da Silva Carvalho<sup>2</sup>, Afrânio L. Kritski<sup>2</sup> and Silvana S. de Miranda<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Research Laboratory in Mycobacteria, School of Medicine of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, <sup>2</sup> Research Center for Tuberculosis, Academic Program in Tuberculosis, School of Medicine of the Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>3</sup> School of Pharmacy of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Leonard Peruski,  
US Centers for Disease Control  
and Prevention, USA

### Reviewed by:

Levent Dalar,  
Istanbul Bilim University, Turkey  
Cristina Vilaplana,  
Institut d'Investigació Germans Trias i  
Pujol, Spain  
Javier Bezos,  
Complutense University of Madrid,  
Spain

### \*Correspondence:

Silvana S. de Miranda  
silvanaspindole@gmail.com

### Specialty section:

This article was submitted to  
Infectious Diseases,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 25 October 2016

**Accepted:** 06 February 2017

**Published:** 15 February 2017

### Citation:

de Almeida IN, de Assis Figueredo LJ, Soares VM, Vater MC, Alves S, da Silva Carvalho W, Kritski AL and de Miranda SS (2017) 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.* 8:249. doi: 10.3389/fmicb.2017.00249

At a global level, with the increase in healthcare costs, there is a need to assess the economic impact of the incorporation of new technologies in different health disorders in different countries. There is scarce information regarding costs incurred with the use of current or new diagnostic tests for tuberculosis or from the vantage point of their incorporation within the healthcare systems of high-burden countries. The present study aimed to assess the mean cost and the activity based cost of the laboratory diagnosis for tuberculosis by means of conventional techniques and from the Detect TB<sup>®</sup>LabTest molecular test kit in a general high-complexity hospital of the public health system in Brazil. Cost analysis was performed by means of primary data, collected in the Mycobacteria and Molecular Biology Laboratory in 2013. The mean cost and activity based cost were, respectively, U\$10.06/U\$5.61 for centrifuged bacilloscopy by Ziehl Neelsen (ZN) and Auramine (AU); U\$7.42/U\$4.15 for direct bacilloscopy by ZN; U\$27.38/U\$16.50 for culture in a Löwenstein-Jensen solid medium; and U\$115.74/U\$73.46 for the Detect TB<sup>®</sup>LabTest Kit. The calculation of the ABC should be used in making decisions by administrators to be the best method of assessing the costs of conventional techniques and molecular method for providing the real value of the tests. So it is need to calculate the ABC, and not of the mean cost, in various scenarios before incorporating new technologies in health institutions.

**Keywords:** tuberculosis, health system, cost analysis, mycobacteria, technology

## INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) remains as one of the central problems of world public health. In 2015, in Brazil, some 71,221 new cases were notified, with 73% confirmed by laboratory diagnosis (bacilloscopy or culture), and 71% presented treatment success (WHO, 2016). The diagnosis of TB by means of high-quality mycobacteriological exams associated with clinical/epidemiological and radiological criteria represent efficient strategies to TB control (BRASIL, 2010). However, these conventional

methods present some disadvantages, such as low sensitivity and specificity, as in the case of the bacilloscopy and chest X-ray (The International Journal of Tuberculosis, and Lung Disease [IJTLD], 2012).

The culture, considered the “gold standard”, has limitations, which are inherently linked to the time needed to obtain the results and the need for a robust infrastructure in the laboratory, which is limited to reference centers (Gholoobi et al., 2014). Molecular diagnosis is reported to have higher sensitivity than bacilloscopy and faster than cultures (Almeida et al., 2015). As of 2008, the World Health Organization (WHO) endorsed the use of molecular methods to detect TB and drug-resistant TB as an alternative to a faster diagnosis of TB (WHO, 2008).

These methods present a high specificity, though lower sensitivity in patients with negative bacilloscopy results. The most commercial molecular methods used to detect TB and drug-resistant TB are the GenoType®MTBDRplus (Biomeuriex) and the Xpert MTB/RIF® (Cepheid). One major advantage of these methods is that these can provide results more quickly than the culture, yet the greatest disadvantage is that they are too expensive and too complex for routine use in contexts with limited resources (Steingart et al., 2015). In Brazil, the Xpert MTB/RIF® was introduced into the public system by recommendation from the Ministry of Health in 2014. A new kit developed in Brazil (Detect TB®LabTestKit, MG, Brazil) has been used for the molecular diagnoses of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTBC) (BRASIL, 2011; Michelon et al., 2011; Schmid et al., 2014).

Nevertheless, in high-burden countries, data concerning the costs incurred with the use of diagnostic tests for TB are scarce in routine conditions, and the TB control programs require decision-making based on algorithms of diagnoses that consider the laboratory costs, as well as those related to clinical treatment and the local prevalence of TB (Shah et al., 2013). At the global level, with the increase in healthcare costs, there is a growing need to assess TB diagnostic methods, both current methods and those planned for future implementation in different countries (Silva, 2003; BRASIL, 2011).

While there are large numbers of studies on accuracy of TB diagnostic tests, there are few studies that are focused on cost. Study conducted in Thailand demonstrated that the costs by Ziehl Neelsen (ZN) and Auramine (AU) were very close. In Zambia compared the values of the culture by different techniques in liquid and solid media found few variations. In South Africa, the cost of molecular method (Xpert MTB/RIF®) was similar to conventional automated liquid culture-based methods and the GenoType®MTBDRplus was higher (Mueller et al., 2008; Sohn et al., 2009a,b; Shah et al., 2013).

Within the methodologies used to calculate the costs of health services, activity based costing (ABC) is appropriate for complex organizations, in which the products consume resources in a highly heterogeneous manner, such as occurs in hospitals. The benefits of ABC are many, especially because it improves managerial decisions; facilitates the determination of relevant costs; allows for the identification of actions geared toward the reduction of overhead costs; provides a greater precision in product costs; determines the costs of services/products; offers

support in the negotiation of contracts; provides support in the increase in revenue, helping customers to understand the cost reductions as consequence of the use of their products and services; gives support for benchmarking; and determines the remainder of shared services (BRASIL, 2006).

A study was recently conducted in Brazil aimed at supplying subsidies for managers to identify the main cost guidelines and possible gains in efficiency and effectiveness when adopting the XpertMTB/RIF; using the ABC as a cost methodology to pinpoint the advantage of being able to observe a significant quantity of tests, thus making it possible to identify a standard cost and conduct a detailed inventory of the cost items (Pinto et al., 2015).

In the Brazilian context, considering that the majority of reference laboratories are structured to conduct bacilloscopies and cultures to detect mycobacteria, it thus becomes necessary to measure the real costs of both these technologies and the Detect TB® kit, the only national molecular method (BRASIL, 2010; Michelon et al., 2011).

Therefore, the present study aimed to assess the mean cost and ABC of the laboratory diagnosis of TB by means of conventional techniques and the Detect TB®LabTest molecular test kit in a high-complexity general hospital from the public health system.

## MATERIALS AND METHODS

### Design and Study Site

This study's cost analysis was performed by means of primary data collected in the Research Laboratory in Mycobacteria (RLM) of the Federal University of Minas Gerais (FUMG) School of Medicine (SM), as well as in the Molecular Biology and Public Health Laboratory (MBPH) of the FUMG School of Pharmacy (SP), from January to December 2013. At RLM, TB laboratory diagnoses are conducted on patients who receive medical care at the hospital complex of the Clinical Hospital (CH)/FUMG, a public and general university hospital that conducts educational, research, and medical care activities. CH/FUMG is a reference hospital in the municipal and state health system concerning medical care provided to patients with mid- and high-complexity pathologies, and consists of one hospital unit and seven outpatient care centers (UFMG, 2015).

### Study's Cost Analysis

The costs of TB laboratory diagnoses (bacilloscopy and culture) were evaluated based on two methodologies: by mean cost and by activity. Mean Cost is calculated through the total cost divided by the quantity produced over a determined period of time (BRASIL, 2006), which, in this study, considered the quantity of exams conducted per month.

The ABC is calculated considering an activity as the denominator for the calculation of the unit cost per activity, rather than the real consumed quantity. The aim of this procedure is to avoid fluctuations in the calculation of the activity's unit cost based on the variation of the real processed quantity. The basic principle of this system is to make the largest possible number of proportional and non-proportional costs

more direct, through cost guidelines, as illustrated in **Figure 1** (Khoury and Ancelevicz, 2000).

To calculate both costs (mean/ABC), this study verified the values of all cost components of the assessed diagnostic methods, such as: infrastructure, equipment, inputs, personal protective equipment (PPE), human resources, and the maintenance of biosafety laboratories (B3), according to the daily routine at RLM/SM/FUMG in 2013. These data were collected by consulting the purchasing, human resources, and maintenance sectors after prior institutional authorization and study approval by the Ethics Committee (CAAE -11821913.6.000.5257, CAAE - 0223.2412.7.1001.5149, DEPE/CH, protocol number 139/12).

### Diagnostic Tests of Tuberculosis Laboratory Routine

The RLM/SM/FUMG counts on two work flows to perform a bacilloscopy: (1) direct bacilloscopy by ZN in samples from emergency rooms and wards at the FUMG Clinical Hospital for the release of exam results in up to four hours; (2) centrifuged bacilloscopy to execute staining by means of the ZN method and fluorescent (AU) of all of the other samples that arrive from the Hospital Complex (out-patient care), including the samples in which the direct bacilloscopy was performed.

The culture is performed in a Lowenstein-Jensen (LJ) solid medium, using four tubes –two tubes without drugs and two with *p*-Nitrobenzoic acid (PNB) and 2-thyphenecarboxylic acid (TCH). The samples are decontaminated by the *N*-Acetyl L-Cysteine (NALC) method (WHO, 2009). Monthly, the RLM conducts an average of 100 bacilloscopies and 91 respiratory sample cultures, such as sputum, bronchoalveolar lavage, and endotracheal aspirates, as well as of extra-pulmonary samples, such as cerebrospinal fluid, urine, biopsies, among others.

To calculate the costs of the Detect TB<sup>®</sup> kit, only the respiratory samples were considered, following both the manufacturer's recommendations (Labtest, 2012) and all of the conditions established by RLM/SM/FUMG and MBPH/SP/FUMG. The number of samples included in the calculation for the Detect TB<sup>®</sup> kit was only one per patient. All

costs were expressed in US, using an exchange rate of US\$ 1 = R\$ 2,34 in 2013 according Brazilian Central Bank.

## RESULTS

### The Cost of Infrastructure

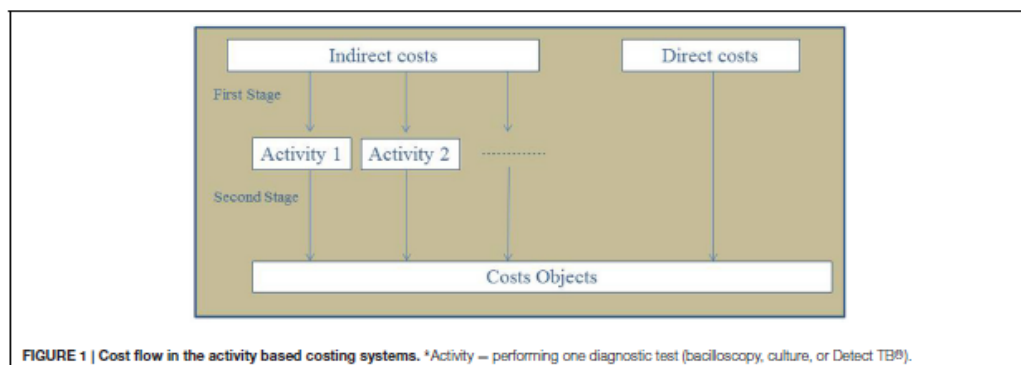
The results of the mean cost of the RLM/SM/FUMG infrastructure are shown in **Table 1**; these items did not influence the ABC of the verified methods. It can be observed that security is the item that most influenced the mean cost.

### The Cost of Diagnostic Tests of Tuberculosis Laboratory Routine

The main items that influenced the mean costs and ABC of the bacilloscopy, culture, and Detect TB<sup>®</sup> kit are shown in **Tables 2–4**, where one can observe an individual difference in the mean cost of the equipment and a similarity of ABC for inputs. The unit value of the disposable apron observed in **Tables 2 and 3** is higher than the other inputs, but did not affect the increase in mean cost and ABC. The mean cost and ABC of the assessed technologies are shown in **Table 4**; the cost components of each exam are listed in **Table 5**. The Detect TB<sup>®</sup> kit presented the highest cost, followed by the culture and the centrifuged and direct bacilloscopies. Among the cost components, in all of the assessed methods, the inputs were what most influenced the increase in the final value of each test followed by human resources, equipment and permanent materials (**Table 6**).

**TABLE 1 | Cost of Infrastructure of Research Laboratory in Mycobacteria and Molecular Biology and Public Health Laboratory, FUMG.**

Item	Total monthly value	Mean cost
Telephone	US\$ 227.35	US\$ 0.45
Electricity	US\$ 291.02	US\$ 0.58
Water	US\$ 400.85	US\$ 0.80
Security	US\$ 3,571.52	US\$ 7.14
Maintenance of B3	US\$ 890.17	US\$ 1.78



**FIGURE 1 | Cost flow in the activity based costing systems. \*Activity – performing one diagnostic test (bacilloscopy, culture, or Detect TB<sup>®</sup>).**



**TABLE 2 | Solid culture on Loweinstein–Jensen – main cost elements**

Equipment	Quantity of laboratories	Unit value	Mean cost	Activity based cost
Refrigerated centrifuge	1	US\$ 8,588.03	US\$ 0.38	US\$ 0.05
Biological Safety Cabinet	2	US\$ 38,461.53	US\$ 3.52	US\$ 0.48
Refrigerator	2	US\$ 512.82	–	–
Freezer –20°C	1	US\$ 789.23	–	–
Bacteriological incubator	3	US\$ 1,945.72	–	US\$ 0.03
Inputs	Quantity per exam	Unit value	Mean cost	Activity based cost
Polypropylene centrifuge tubes	1	US\$ 0.51	US\$ 0.55	US\$ 0.51
Disposable apron (unit)	1*	US\$ 7.99	US\$ 1.46	US\$ 1.33
Tube with LJ medium	2	US\$ 1.98	US\$ 3.97	US\$ 3.97
Tube with LJ medium with TCH	1	US\$ 1.98	US\$ 1.98	US\$ 1.98
Tube with LJ-PNB medium	1	US\$ 1.98	US\$ 1.98	US\$ 1.98

\*1 per day of work; LJ, Loweinstein–Jensen; TCH, 2-thyphenecarboxylic acid; PNB, p-Nitrobenzoic acid. Mean Cost is calculated through the total cost divided by the quantity produced over a determined period of time (BRASIL, 2006). ABC is calculated considering an activity as the denominator for the calculation of the unit cost per activity, rather than the real consumed quantity (Khoury and Anselovicz, 2000). Exchange rate of US\$ 1 = R\$ 2,34 in 2013 according Brazilian Central Bank.

**TABLE 3 | Cost of the main equipment and inputs for bacilloscopy.**

Equipment	Quantity of laboratories	Unit value	Mean cost	Activity based cost
Test stand with running water	1	US\$ 2,564.10	–	US\$ 0.01
Binocular microscope	1	US\$ 1,227.35	–	–
Led microscope	1	US\$ 24,798.88	US\$ 1.02	US\$ 0.15
Refrigerated centrifuge	1	US\$ 8,588.03	–	US\$ 0.05
Biological Safety Cabinet	2	US\$ 38,461.53	US\$ 3.20	US\$ 0.48
Refrigerator	2	US\$ 512.82	–	–
Freezer –20°C	1	US\$ 789.23	–	–
Inputs	Quantity per exam	Unit value	Mean cost	Activity based cost
Glass slides for microscopy	2	US\$ 0.62	US\$ 1.24	US\$ 1.24
Polypropylene centrifuge tubes	1	US\$ 0.51	US\$ 0.51	US\$ 0.51
Disposable apron (unit)	1*	US\$ 7.99	US\$ 1.33	US\$ 1.33

\*1 per day of work. Mean Cost is calculated through the total cost divided by the quantity produced over a determined period of time (BRASIL, 2006). ABC is calculated considering an activity as the denominator for the calculation of the unit cost per activity, rather than the real consumed quantity (Khoury and Anselovicz, 2000). Exchange rate of US\$ 1 = R\$ 2,34 in 2013 according Brazilian Central Bank.

**TABLE 4 | Main laboratory issued with impact on Detect TB<sup>®</sup> test costs.**

Equipment	Quantity of laboratories	Unit value	Mean cost	Activity based cost
Biological Safety Cabinet	2	US\$ 38,461.53	US\$ 8.01	US\$ 4.45
MilQ Water Purifier	2	US\$ 7,692.30	US\$ 1.60	US\$ 0.88
Elisa Scanner	1	US\$ 11,538.46	US\$ 1.19	US\$ 0.66
Hybridization Incubator	1	US\$ 5,789.23	US\$ 0.59	US\$ 0.33
Thermocycler	1	US\$ 10,256.41	US\$ 1.06	US\$ 0.59
Inputs	Quantity per exam	Unit value	Mean cost	Activity based cost
Detect TB <sup>®</sup> KIT	–	US\$ 2,289.74	US\$ 31.80	US\$ 31.80
Disposable apron (unit)	1*	US\$ 7.99	US\$ 1.33	US\$ 1.33
Nozzles with filter (26 per exam)	26	US\$ 0.09	US\$ 2.55	US\$ 2.55
Microtubes	4	–	–	US\$ 0.03
Disposable gloves	1	US\$ 0.05	–	US\$ 0.11

\*1 per day of work. Mean Cost is calculated through the total cost divided by the quantity produced over a determined period of time (BRASIL, 2006). ABC is calculated considering an activity as the denominator for the calculation of the unit cost per activity, rather than the real consumed quantity (Khoury and Anselovicz, 2000). Exchange rate of US\$ 1 = R\$ 2,34 in 2013 according Brazilian Central Bank.

**TABLE 5 | Mean and activity based cost from the Research Laboratory in Mycobacteria and Molecular Biology and Public Health Laboratory, FUMG.**

Method	Number of samples/month	Mean cost	Activity based cost
Centrifuged Bacilloscopy (ZN and AU)	100	US\$ 10.06	US\$ 5.61
Centrifuged Bacilloscopy (AU)	100	US\$ 9.26	US\$ 4.85
Centrifuged Bacilloscopy (ZN)	100	US\$ 8.29	US\$ 4.72
Direct Bacilloscopy (ZN) *	100	US\$ 7.42	US\$ 4.15
Culture in LJ Solid Medium	91	US\$ 27.38	US\$ 16.50
Detect TB®	40	US\$ 115.74	US\$ 73.46

\*Performed when request for bacilloscopy is urgent. ZN, Ziehl Neelsen, AU, Auramine O. ABC is calculated considering an activity as the denominator for the calculation of the unit cost per activity, rather than the real consumed quantity (Khoury and Ancelevicz, 2000). Exchange rate of US\$ 1 = R\$ 2,34 in 2013 according Brazilian Central Bank.

**TABLE 6 | Cost components of activity based cost for each diagnostic test.**

	Inputs per test	Equipment and permanent materials	Human resources	Total
Detect TB®	US\$ 36.46 (55%)	US\$ 7.62 (11%)	US\$ 29.35 (34%)	US\$ 73.46
Solid Medium Culture	US\$ 11.40 (78%)	US\$ 0.62 (4%)	US\$ 3.19 (18%)	US\$ 16.50
Bacilloscopy by Fluorescence (AU)	US\$ 3.08 (64%)	US\$ 0.50 (10%)	US\$ 1.26 (26%)	US\$ 4.85
Centrifuged Bacilloscopy (ZN)	US\$ 3.10 (66%)	US\$ 0.35 (8%)	US\$ 1.26 (26%)	US\$ 4.72
Direct Bacilloscopy (ZN)	US\$ 2.56 (62%)	US\$ 0.30 (7%)	US\$ 1.28 (31%)	US\$ 4.15
Centrifuged Bacilloscopy (ZN and AU)	US\$ 3.84 (69%)	US\$ 0.50 (9%)	US\$ 1.26 (22%)	US\$ 5.61

ZN, Ziehl Neelsen; AU, Auramine O. ABC is calculated considering an activity as the denominator for the calculation of the unit cost per activity, rather than the real consumed quantity (Khoury and Ancelevicz, 2000). Exchange rate of US\$ 1 = R\$ 2,34 in 2013 according Brazilian Central Bank.

## DISCUSSION

The mean cost was higher than the ABC in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in the laboratory routine of a High-Complexity Hospital in Brazil. The results of the mean cost and ABC found in this study were of utmost importance for the restructuring of laboratory activities, since, faced with these results, the routine of performing one slide stained with ZN and one with AU in centrifuged bacilloscopy was changed to only one slide stained with AU.

The impact that this result caused in the laboratory's routine showed the substantial advantage of having used the ABC as the methodology, as well as the importance of conducting cost studies based on data that has been duly computed and not merely estimated based on other studies or the price of the Unique Health System in Brazil. These data can serve as a parameter for other public laboratories in Brazil that perform the same TB diagnostic methods, in addition to affirming that the correct count of the costs incurred in public services is an important instrument for social control and the assessment of the efficiency of services rendered (Martins, 2003).

The Detect TB® kit was the method that presented the highest costs. Nonetheless, it cannot be inferred whether or not the implementation of this would in fact be more costly, given that the sensitivity and specificity described by Michelon et al. (2011), showed from 75 to 100% and 98 to 100%, respectively, as compared to the bacilloscopy and culture, and presents the advantage of a shorter waiting time for the release of the result as compared to the culture. This fact reinforces the need for a cost

study on the effectiveness of this test in low-prevalence locations, such as that carried out in the present work.

The values found for the Detect TB® kit are similar to other studies where molecular tests are assessed together with conventional techniques (Shah et al., 2013). The value of the Detect TB® kit (US\$73.46) found in our study is less than the value of the Xpert MTB/RIF® molecular method (US\$ 503.05, value of the cartridge) when not subsidized by the health system (BRASIL, 2013; FIND, 2013).

As regards, the bacilloscopy, it could be observed that there is no need to perform two methods of staining, since the costs are approximate and the AU technique is quick and sensitive, and does not expose the technicians to toxic vapors released when heating ZN (BRASIL, 2010). Despite the lower cost of staining by ZN without centrifugation, this method is less sensitive than centrifugation (WHO, 2009). The values of bacilloscopy found in the present study differ from the values cited in a similar study carried out in South Africa, where the ABC of the bacilloscopy stained with AU presented the value of US\$3.40 and with ZN of US\$2.25. Nevertheless, the values from the present study are near those found in different scenarios in Brazil, where the ABC of both staining methods was US\$4.86 and for the mean cost was US\$ 6.05 (BRASIL, 2013; Shah et al., 2013). The costs of bacilloscopy in Thailand by ZN and AU were US\$1.16 and US\$1.03 respectively. In Zambia compared the values of the culture by means of different techniques in liquid and solid media found a variation between US\$28 and \$32. However, these studies did not evaluate the mean cost and ABC. (Sohn et al., 2009a,b).

In the case of the culture, costs identified in the present study (US\$ 16.50) were similar to other studies carried out in Brazil and



Africa, with a variation from US\$ 12.35 to US\$ 28.00 (Mueller et al., 2008; Chihota et al., 2010; BRASIL, 2013).

The results of the ABC of the bacilloscopy and culture found in this study and those reported in national literature (BRASIL, 2013) are higher than the Brazilian Unified Health System's pay (US\$ 1.79 for bacilloscopy and US\$ 2.29 for cultures), which alerts to the fact that these values do not reflect the real cost. This divergence confirms the relevance of the assessment of ABC, as the horizontal view of this parameter made it possible to reach an analysis that was not restricted to profit. This view is based on the planning, performing, and aid in strategic decision-making, as well as in the changes in processes, the elimination of waste, and the drafting of estimates based on the executed activities, thus increasing the efficiency of public services (Martins, 2003; Alonso, 2009).

In some countries of Asia and America the health system is private or public-private. In this context, the cost studies are important to improve the ability of management and financing of TB control programs (WHO, 2016).

The limitation of this study, rely on the fact that the individual costs of the patients were not inferred, such as: transport, outcome, among others, which are important variables for future studies on cost effectiveness and the implementation of an algorithm in laboratory diagnoses and strategies for the TB control. In addition, this study was carried out with local data from an NB3 laboratory geared exclusively towards the diagnosis of TB and other mycobacteria from high-complexity hospitals and from Molecular Biology laboratories.

## REFERENCES

- Almeida, I. N., Aleixo, A. V., Carvalho, W. S., and Miranda, S. S. (2015). In-house PCR with DNA extracted directly from positive slides to confirm or exclude the diagnosis of tuberculosis: focus on biosafety. *Rev. Argent. Microbiol.* 47, 47–49. doi: 10.1016/j.ram.2014.12.002
- Alonso, M. (2009). Custos no serviço público. *RSP* 50, 37–63.
- BRASIL (2006). "Ministério da Saúde," in *Manual Técnico de Custos – Conceitos e Metodologias*, eds E. Ricciardi-Souza, M. M. L. de Lucena Horst, and R. V. Teixeira de Freitas (Brasília: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos).
- BRASIL (2010). "Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias," in *Secretaria de Vigilância em Saúde*, ed. F. Camilo (Brasília: Ministério da Saúde).
- BRASIL (2011). "Ministério da Saúde," in *Xpert MTB/RIF No Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar*, Vol. 16, eds C. A. Petramale, M. Regina de Oliveira, and F. T. Silva Elias (Brasília: BRATS), 1–13.
- BRASIL (2013). *Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Relatório Técnico: Estudos Econômicos da Incorporação do Teste Molecular GeneXpert MTB/Rif Para o Diagnóstico de Tuberculose Pulmonar no Sistema Único de Saúde*. Available at: [http://www.fundacaoatualphodepaiva.com.br/2013/07/Relatoriotecnico\\_25042013.pdf](http://www.fundacaoatualphodepaiva.com.br/2013/07/Relatoriotecnico_25042013.pdf)
- Chihota, V. N., Grant, A. D., Pieling, K., Ndibongo, B., ZylVan, A., Muthhead, D., et al. (2010). Liquid vs. solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource-constrained setting. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 14, 1024–1031.
- FIND (2013). *Foundation for Innovative New Diagnostics. Negotiated Prices for Xpert MTB/RIF*. Available at: <http://www.finddiagnostics.org/>
- Cholooobi, A., Masoudi-Kazemabad, A., Meshkat, A., and Meshkat, Z. (2014). Comparison of culture and PCR methods for diagnosis of *Mycobacterium*

## CONCLUSION

The calculation of the ABC should be used in making decisions by administrators to be the best method of assessing the costs of conventional techniques and molecular method for providing the real value of the tests. So, it is need to calculate the ABC, and not of the mean cost, in various scenarios before incorporating new technologies in health institutions.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Design of study: IA and SdM. Development of Cost chain: MV and SA. Data analysis: IA, MV, and SA. Article writing: IA, VS, WdSC, LJdAF, and SdM. Article review: MV, SA, AK. Production of the article's final version: IA, VS, LJdAF, WdSC, MV, SA, AK. Promotion of study financing: SdM and AK. All the authors read and approved the final manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank the Minas Gerais Research Support Foundation (FAPEMIG) (Process number – APQ 03266-13/APQ 00094-12), the National Research Council (CNPq) (Process number – CNPq 310174/2017-7 446796/2014), Labtest, INCT (Process number – CNPq /INCT 573548/2008-0), the Post-Graduate Program in Tropical Medicine and Infectology from the FUMG School of Medicine, Pro Rectory Research/UFMG, and the Brazilian Tuberculosis Network (REDE TB).

*tuberculosis* in different clinical specimens. *Jundishapur J. Microbiol.* 7, 8939. doi: 10.5812/jjm.8939

- Khoury, C. Y., and Ancelevicz, J. (2000). Controvérsias acerca do sistema de custos ABC. *ERA* 40, 56–62. doi: 10.1590/s0034-75902000000100007
- Labtest (2012). *Detect TB – Instruções de Uso. Copyright by Labtest Diagnóstica S.A. Ref. 010713*. Lagoa Santa: Labtest Diagnóstica S.A.
- Martins, E. (2003). *Contabilidade de Custos*, 9th Edn. São Paulo: Atlas.
- Michelson, C. T., Rosso, F., Schmid, K. B., Sperhake, R. D., Oliveira, M. M., Kritski, A. L., et al. (2011). Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 194–199. doi: 10.1590/S0074-02762011000200013
- Mueller, D. H., Mwenge, L., Muyoyeta, M., Muvwimi, M. W., Tembwe, R., McNeerney, R., et al. (2008). Costs and cost-effectiveness of tuberculosis cultures using solid and liquid media in a developing country. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12, 1196–1202.
- Pinto, M., Entringer, A. P., Steffen, R., and Trajman, A. (2015). Análise de custos de um teste de amplificação de ácido nucleico para o diagnóstico da tuberculose pulmonar sob a perspectiva do Sistema Único de Saúde. *J. Bras. Pneumol.* 41, 1–3.
- Schmid, K. B., Scherer, L., Barcellos, R. B., Kuhleis, D., Prestes, I. V., Steffen, R. E., et al. (2014). Smear plus detect TB for a sensitive diagnosis of pulmonary tuberculosis: a cost-effectiveness analysis in a incarcerated population. *BMC Infect. Dis.* 14:678. doi: 10.1186/s12879-014-0678-x
- Shah, M., Chihota, V., Coetzee, G., Churchyard, G., and Dorman, E. S. (2013). 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.* 13:352. doi: 10.1186/1471-2334-13-352

- Silva, L. K. (2003). Avaliação tecnológica e análise custo-efetividade em saúde: a incorporação de tecnologias e a produção de diretrizes clínicas para o SUS. *Cien. Saude. Colet.* 8, 501–520. doi: 10.1590/S1413-81232003000200014
- Sohn, H., Minton, J., Albert, H., Dheda, K., and Pai, M. (2009a). TB diagnostic tests: how do we figure out their costs? *Expert Rev. Ant. Infect. Ther.* 7, 723–733. doi: 10.1586/eri.09.52
- Sohn, H., Sinthuwatianawibool, C., Rienthong, S., and Varma, J. K. (2009b). Fluorescence microscopy is less expensive than Ziehl-Neelsen microscopy in Thailand. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 13, 266–268.
- Stetngart, K. R., Schiller, I., Horne, D. J., Pai, M., Boehme, C. C., and Dendukuri, N. (2015). Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults (Review). *Cochrane Database Syst. Rev.* 1, 1–131.
- The International Journal of Tuberculosis, and Lung Disease [IJTLD] (2012). Editorial - Chest radiography for tuberculosis screening is back on the agenda. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 16, 1421–1422. doi: 10.5588/ijtld.12.0774
- UFMG (2015). *Hospital das Clínicas*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.
- WHO (2008). *Policy Statement. Molecular Line Probe Assays for Rapid Screening of Patients at Risk of Multidrug-Resistant tuberculosis*. Available at: [http://www.who.int/tb/features\\_archive/policy\\_statement.pdf](http://www.who.int/tb/features_archive/policy_statement.pdf)
- WHO (2009). *Approaches to Improve Sputum Smear Microscopy for Tuberculosis Diagnosis*. Available at: [http://www.who.int/laboratory/egmreport\\_microscopymethods\\_nov09.pdf](http://www.who.int/laboratory/egmreport_microscopymethods_nov09.pdf)
- WHO (2016). *Global Tuberculosis Report*. Available at: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report.pdf)
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2017 de Almeida, de Assis Figueiredo, Soares, Vater, Alves, da Silva Carvalho, Kritski and de Miranda. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

***Mycobacterium tuberculosis* RD<sup>Rio</sup> na tuberculose resistente em Minas Gerais, Brasil**

Isabela Neves de Almeida<sup>a</sup>, Lida Jouca de Assis Figueredo<sup>a</sup>, Sidra E. G. Vasconcellos<sup>b</sup>, Nayanne Gama Teixeira Dantas<sup>a</sup>, Cláudio José Augusto<sup>a</sup>, João Paulo Amaral Hadaad<sup>c</sup>, Wânia da Silva Carvalho<sup>d</sup>, Philip Noel Suffys<sup>b</sup>, Silvana Spíndola de Miranda<sup>a</sup>

Laboratório de Pesquisa em Micobactérias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil<sup>a</sup>; Laboratório de Biologia Molecular aplicada a Micobactérias, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil<sup>b</sup>, Escola de Veterinária UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil<sup>c</sup>, Faculdade de Farmácia UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil<sup>d</sup>

## Resumo

Nas últimas décadas a sublinhagem do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) RD<sup>Rio</sup> foi descrita como o genótipo predominante no Rio de Janeiro, sendo associada a família Latino - Americana – Mediterrânea (LAM) e a tuberculose multidroga resistente (TB-MDR). O objetivo deste estudo foi investigar a frequência de cepas do *M. tuberculosis* RD<sup>Rio</sup> no estado de Minas Gerais e sua relação com a tuberculose resistente. Foram selecionados, por conveniência, 223 isolados do *M. tuberculosis* sensíveis e 104 isolados TB-MDR. Os isolados são provenientes de amostras pulmonares de pacientes diagnosticados no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2011. O DNA extraído desses isolados foi analisado por meio do *Spoligotyping*; PCR-RFLP *fbpC*<sup>103</sup>/Ag85C103; PCR Multiplex RD<sup>Rio</sup> e PCR- Multiplex RD174. Foram excluídos 92 isolados (41 resistentes e 51 sensíveis) por que não amplificaram na PCR. O padrão RD<sup>Rio</sup> foi identificado em 51,91% (122/235) (I.C 0,45 – 0,58) dos isolados, seguido de 100/235 (42,5%) padrão selvagem e 13/235 (5,53%) padrão misto. Dos 63 *M. tuberculosis* resistentes 41/63 (65.1%) e 81/172 (47,1%) sensíveis apresentaram padrão RD<sup>Rio</sup> ( $p = 0,001$ ) e o marcador RD174 foi mais frequente nas sensíveis ( $p = 0,001$ ). A sublinhagem RD<sup>Rio</sup> foi mais frequente na TB-MDR, nos isolados sensíveis o marcador RD174 predominou, a família LAM e a linhagem LAM9 foram as mais identificadas. Novos estudos para avaliar a virulência e transmissão da TB devem ser realizados no Brasil, assim como novos estudos para acompanhar a evolução genética do *M. tuberculosis*.

**Palavras-Chave:** Tuberculose Multidroga Resistente, *Mycobacterium tuberculosis*, Epidemiologia Molecular

## Introdução

A epidemia de tuberculose (TB) apresenta-se maior do que a estimada nos últimos anos. No ano de 2015, foram notificados 10,4 milhões de novos casos de TB em todo o mundo, sendo, 480 000 novos casos de tuberculose multidroga resistente (TB-MDR) e mais 100 000 casos resistentes a rifampicina (TB-RR) que também foram recentemente elegíveis para o tratamento da TB-MDR<sup>1</sup>.

O *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) é o patógeno humano que mais tem sofrido evolução clonal originando linhagens divergentes que estão associadas a regiões geográficas específicas e possivelmente com populações étnicas humanas distintas<sup>2</sup>. Essas linhagens têm demonstrado diferenças biológicas em relação a transmissibilidade<sup>3</sup>.

A Família LAM (Latino Americana – Mediterrânea) é responsável por aproximadamente 15% da carga global de TB e está presente em 46% dos isolados que foram analisados por meio de técnicas de genotipagem no Brasil<sup>4</sup>. Mais especificamente a linhagem LAM9 representa 10,2% dos isolados de *M. tuberculosis* no continente Americano<sup>5</sup>.

Em 2007, Lazzarini et al, descreveram o *M. tuberculosis* RD<sup>Rio</sup> como uma sublinhagem derivado da família LAM. Acredita-se que este genótipo teve origem a partir de um progenitor LAM9 e posteriormente se expandiu com perdas sucessivas de espaçadores sendo atualmente relacionado principalmente as sublinhagens: LAM1, LAM2 e em menor proporção LAM4, LAM5 e LAM6<sup>6,7</sup>.

O *M. tuberculosis* RD<sup>Rio</sup> é geneticamente caracterizado pela a deleção de 26.3 kb que resultou na perda e modificação de 10 genes, incluindo dois genes PPE (*Proline-glutamic Acid Proteins*) que codificam proteínas específicas que desempenham papel importante na resposta imune<sup>5</sup>. Essa sublinhagem tem sido associada com níveis mais elevados de transmissão, gravidade da doença, assim como tem sido relacionada a TB-MDR e isolada em diversos locais no Brasil e em outros países<sup>7,2,3</sup>.

As análises moleculares, baseadas em marcadores genéticos específicos, permitem a rápida identificação de diferentes níveis de espécies e sublinhagens, sendo uma ferramenta importante para o estudo da evolução e transmissão do *M. tuberculosis*<sup>8</sup>. O marcador utilizado para a caracterização da família LAM é o SNP (*Single Nucleotide*

*Polymorphism*) Ag85C103/ *fbpC*<sup>103</sup> considerado importante alternativa devido a sua alta especificidade, assim como o “*Region of Difference*” RD174, conhecido como um co-marcador para LAM e RD<sup>Rio</sup> e por estar relacionado a sublinhagens com maior grau de transmissibilidade<sup>7,3,8,9</sup>. O objetivo desse estudo foi avaliar a frequência do isolamento do *M. tuberculosis* RD<sup>Rio</sup> no estado de Minas Gerais e sua relação com a TB-MDR utilizando marcadores moleculares específicos para a família LAM e para a sublinhagem RD<sup>Rio</sup>.

## **Materiais e Métodos**

### *Desenho do estudo*

Foram selecionadas, por conveniência, 223 isolados do *M. tuberculosis* sensíveis e 104 isolados TB-MDR. Os isolados foram provenientes de amostras pulmonares dos pacientes diagnosticados no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2011. A identificação do *M. tuberculosis* foi realizada por meio dos testes fenotípicos<sup>10</sup> e o teste de sensibilidade no sistema BACTEC<sup>TM</sup> MGIT<sup>TM</sup> 960 (Becton Dickinson<sup>®</sup>) conforme instruções do fabricante<sup>11</sup>, no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais (LACEN-MG) do Instituto Octávio Magalhães da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

### *Extração de DNA*

O DNA genômico do *M. tuberculosis* foi extraído de colônias subcultivadas em meio sólido Lowenstein-Jensen utilizando 10 % Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB) conforme descrito por Dantas et al. 2015<sup>12</sup>. O DNA extraído foi utilizado para as técnicas descritas abaixo. Os experimentos foram realizados em duplicata com exceção do *Spoligotyping*.

### *PCR Multiplex RD<sup>Rio</sup>*

A detecção do perfil RD<sup>Rio</sup> foi realizada por meio de PCR multiplex, utilizado 20 pmol/ $\mu$ L de cada iniciador: BridgeRD<sup>Rio</sup>F, BridgeRD<sup>Rio</sup>R, IS1561F e IS161R em um volume final de 50  $\mu$ L contendo 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 1U Taq DNA polimerase (Phoneutra<sup>®</sup>), 1X *buffer*, 10% DMSO e 10 ng de DNA. As amplificações foram realizadas com o seguinte ciclo: 5 min 95 C seguido de 45 ciclos de 1 min 95°C, 1 min 60°C, 4 min 72°C e uma extensão final de 10 min 72°C em termociclador Veriti 96 WellThermocycler (AppliedBiosystems<sup>®</sup>). Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5%, observando a presença ou ausência de fragmentos de 1175 e/ou 530 pb. O padrão RD<sup>Rio</sup> apresenta o fragmento de 1175 pb, e o padrão selvagem fragmento de 530 pb, e em caso de aparecimento de ambos os fragmentos trata-se de um padrão misto<sup>6,7,8</sup>.

### *PCR- Multiplex RD174*

Para a amplificação foram utilizados 40 pmol/ $\mu$ L de cada um dos tres iniciadores a seguir: RD174 F, RD174Fi e RD174 R em uma reação contendo: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 1U Taq DNA polimerase (Phoneutra<sup>®</sup>), *buffer* 1X e 10 ng de DNA, em um volume final de 50  $\mu$ L. As amplificações foram realizadas com as seguintes condições: desnaturação inicial de 5 min 95°C seguido por 45 ciclos de 1 min 95°C, 1 min 60°C, 4 min 72°C e extensão final de 10 min 72°C em termociclador Veriti 96 WellThermocycler (AppliedBiosystems<sup>®</sup>). Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% e coloração do DNA com brometo de etídio (1 $\mu$ g/mL). Para determinação dos fragmentos amplificados pela PCR, 5 $\mu$ L do produto da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 2%. Os isolados que apresentam a região RD174 intacta possuem fragmentos de 300 pb e os com deleção 500pb<sup>7,8</sup>.

### *Spoligotyping*

O *Spoligotyping* foi realizado por meio da técnica em microesferas Beamedex<sup>®</sup> no sistema Luminex Bioplex BioRad 200<sup>®</sup>, desenvolvida no *Institut de Génétique et Microbiologie Université Paris-Sud*, seguindo o protocolo descrito por Zhang et al. 2010<sup>13</sup>.

### *PCR-RFLP *fbpC*<sup>103</sup>/Ag85C103*

O SNP *fbpC*<sup>103</sup> ou Ag85C103 foi descrito como marcador específico para a linhagem LAM por Gibson et al., 2008. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi adaptada e descrita por Vasconcelos et al., 2014. Para a amplificação foram utilizados 40 pmol/μL de cada um dos iniciadores, *fbpC*103 F e *fbpC*<sup>103</sup> R em reações contendo: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTPs, 1U Taq DNA polimerase (Phoneutra<sup>®</sup>), *buffer* 1X, 10% Dimetilsulfóxido (DMSO) e 10 ng de DNA, em um volume final de 50 μL. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial por 5min 95°C seguido por 45 ciclos de 1 min 95°C, 1 min 60°C, 4 min 72°C e extensão final de 10 min 72°C em termociclador Veriti 96 WellThermocycler (AppliedBiosystems<sup>®</sup>). Os produtos amplificados (519 pb) foram analisados em gel de Agarose 2% em TBE 1X e corados com Brometo de Etídio (1 μg/mL), 15μL do produto amplificado foram submetidos à digestão enzimática com 1U da enzima de restrição MnlI a 37°C por 4 horas (New EnglandBioLabs Inc. USA) seguindo as recomendações do fabricante. A enzima MnlI apresenta três fragmentos de restrição no produto amplificado: 365 pb, 96 pb e 48 pb. A presença do SNP (G309A) (LAM) resulta na perda de um dos três sítios de restrição<sup>7,8</sup>, o que foi verificado em gel de Agarose 3% (TBE 1X) e comparando amplicons com marcadores moleculares de 50pb e 100pb (Fermentas<sup>®</sup>)<sup>7,8</sup>.

### *Análises Estatísticas*

Os cálculos foram realizados pelos programas STATA 12 Copyrigh 1985-2015 StataCorpLP<sup>®</sup>USA.

### *Análise filogenética*

As análises foram realizadas pelo *site* livre SITVITwebsite [http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT\\_ONLINE/](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/).



## Resultados

Dos 327 *M. tuberculosis* selecionados 92 foram excluídos (41 resistentes e 51 sensíveis) por que não amplificaram na PCR, restando 235 isolados *M. tuberculosis*.

### *Identificação e avaliação do M. tuberculosis RD<sup>Rio</sup>*

Dos 235 *M. tuberculosis* 51,91% (122/235) (I.C 0.45 – 0.58) foram identificadas como RD<sup>Rio</sup>, 100/235 (42,5%) selvagens e 13/235 (5,53%) padrão misto.

Dos 63 *M. tuberculosis* resistentes 41/63 (65,1%) apresentaram padrão RD<sup>Rio</sup> e dos 172 sensíveis 81/172 (47,1%) apresentaram padrão RD<sup>Rio</sup>. Essa diferença foi significativa ( $p = 0.001$ ).

Dos 122 *M. tuberculosis* RD<sup>Rio</sup> 116/122 (95,1%) foram identificados como LAM e o restante como selvagens (n=6) por meio do SNP Ag85C103. Essa relação foi significativa ( $p = 0.000$ ).

Após análise pelo *Spoligotyping* das linhagens do *M. tuberculosis* RD<sup>Rio</sup> foi encontrado a seguinte distribuição: 33 LAM9 (27%), 28 LAM1 (23%), 22 LAM2 (18%), 7 LAM4 (6%), 7 LAM5 (6%), 4 LAM11 (3,3%), 3 LAM3 (2,5%) e 1 LAM6 (0,8%). O demais isolados RD<sup>Rio</sup> pertenciam as linhagens T1 4% (n=5), H3 0,8% (n=1), Haarlem 0,8% (n=1), X2 0,8% (n=1) e 9 (7%) foram classificadas como “*Unknow*”.

Os padrões encontrados e sua relação com as respectivas linhagens estão demonstrados na tabela 1.

### *Identificação do padrão RD174*

Das 235 *M. tuberculosis* o padrão RD174 foi identificado em 41,7% (98/235), 47,2% (111/235) como selvagem e 11,1% (26/235) misto. Dos 98 que apresentaram o RD174, 93 (94,9%) foram identificados como RD<sup>Rio</sup> ( $p = 0.000$ ) (Tabela 1). Das 98 RD174, 70/98 (71,43%) eram sensíveis e 28 (28,57%) resistentes ( $p=0.001$ ).





UNKNOWN	UNKNOWN	740001607760771	+	LAM	0	1
UNKNOWN	UNKNOWN	177700607760771	+	LAM	0	1
UNKNOWN	UNKNOWN	77777607740431	+	NÃO-LAM	0	1

Legenda: + : Padrão RD174 - : Selvagem +/- : Padrão Misto (amplificou a sequência selvagem e RD174).

*Classificação das Linhagens por Spoligotyping*

A classificação das linhagens dos 172 *M. tuberculosis* sensíveis e dos 63 MDR estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação das Linhagens do *M. tuberculosis* em Minas Gerais

<i>M. tuberculosis</i>		
Linhagens	Sensível <sub>n=172</sub> (%)	MDR <sub>n=63</sub> (%)
LAM 9	34 (19,7)	18 (28,5)
LAM 1	20 (11,6)	13 (20,6)
LAM 2	18 (10,5)	4 (6,3)
LAM 3	12 (6,9)	2 (3,7)
LAM 4	6 (3,5)	2 (3,7)
LAM 5	5 (2,9)	3 (4,7)
LAM 6	2 (1,2)	-----
LAM 11-ZWE	4 (2,3)	-----
T1	16 (9,3)	9 (14,2)
T2	2 (1,2)	2 (3,7)
T3	2 (1,2)	-----
T4-CEU	2 (1,2)	-----
T5-Madrid2	2 (1,2)	-----
T3/T2	1 (1,6)	-----
H1	4 (2,3)	1 (1,5)
H2	2 (1,2)	-----
H3	10 (5,8)	1 (1,5)
Haarlem	2 (1,2)	-----
X2	9 (5,2)	2 (3,7)
ORPHAN	4 (2,3)	-----
<i>Unknow</i>	18 (10,5)	7 (11,1)

*Identificação do SNP Ag85C103 e comparação com o Spoligotyping*

Dos 235 *M. tuberculosis* identificados pelo SNP Ag85C103, 74,4% (175/235) foram classificados como LAM, 23% (54/235) como Não-LAM e 2,5% (6/235) padrão misto. Das 175 LAM identificadas pelo SNP Ag85C103, 136 também foram identificadas pelo *Spoligotyping*, e os 39 restantes como “*Unknow*” (n=20), T1 (n=12), X2 (n=2), H3 (n=2) e HARLEEM (n=1).

Das 54 não LAM o *Spoligotyping* identificou como LAM1 (n=2), LAM2 (n=1) e LAM9 (n=1). Dos seis identificados como padrão misto no SNP Ag85C103 apenas um foi classificado como LAM9 pelo *Spoligotyping*.

O SNP Ag85C103 detectou maior quantidade de LAM do que o *Spoligotyping* e essa diferença foi significativa ( $p = 0.000$ ). Quando comparado a frequência de LAM detectada pelo Ag85C103 entre o *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes não houve diferença estatística ( $p = 0.309$  Qui-quadrado e  $p = 0.428$  Fisher's).

## Discussão

A predominância das RD<sup>Rio</sup> entre as MDR em relação as sensíveis demonstra que esse genótipo está associado com a TB resistente. Em 2007, Lazzarini et al, sugeriram que o RD<sup>Rio</sup> originou de um progenitor comum pois a deleção do IS1561 foi também encontrada em outros países, além de sua capacidade de TB primária progressiva evoluir para um fenótipo multirresistente<sup>6</sup>. Os resultados obtidos nesse estudo são semelhantes aos dados obtidos em Porto Alegre onde o RD<sup>Rio</sup> foi encontrado em 56 dos 115 MDR, sendo causador da metade dos casos resistentes<sup>14</sup>. Em estudo realizado em Portugal, a frequência de RD<sup>Rio</sup> foi de 60% entre os isolados MDR<sup>3</sup>, e nos Estados Unidos e na Espanha apesar da frequência de RD<sup>Rio</sup> nas MDR não ter sido maior que nas sensíveis, este também foi identificado entre cepas MDR e monoresistentes a isoniazida<sup>2,15</sup>.

Nos estudos realizados na Espanha e nos Estados Unidos o RD<sup>Rio</sup> foi encontrado em maior proporção em pacientes hispânicos. Lazzarini et al 2008 ao analisarem isolados de várias partes do Brasil sugeriram que a sublinhagem RD<sup>Rio</sup> LAM pode causar doença mais severa (lesões pulmonares cavitárias) e provavelmente contribui para a transmissão da TB em certas populações étnicas<sup>6,14,15</sup>. O RD<sup>Rio</sup> pode ter alguma vantagem biológica em relação a outros genótipos, devido a deleção de dois genes PPE (PPE55 e PPE56) e minimizar o reconhecimento imunológico do hospedeiro, levando a uma maior virulência e/ou transmissibilidade<sup>9,14</sup>.

No nosso estudo a deleção do RD174 do *M. tuberculosis* foi predominante entre os isolados sensíveis em comparação aos MDR mostrando possível relação desse marcador com a alta transmissibilidade desses isolados, como também descrito por outros autores<sup>7,9</sup>. Em um estudo que avaliou os RD em contatos de TB demonstrou o RD174 como segundo marcador mais frequente, sugerindo maior transmissão. O primeiro marcador foi o RD702, porém estava relacionado a transmissão do *M. africanum*<sup>9</sup>.

Nesse trabalho, apesar do RD174 ter sido identificado na maior parte dos RD<sup>Rio</sup> (76,2%), ele não pode ser considerado um marcador absoluto para essa sublinhagem, pois pode superestimar a frequência de RD<sup>Rio</sup> como descrito por outro autor<sup>7</sup>. Ao contrário dos resultados observados por Gibson et al 2008, que considerou o RD174 como um marcador absoluto para o RD<sup>Rio</sup>, isso pode ser devido a seleção de amostras.

A alta frequência de RD<sup>Rio</sup> na população desse estudo pode ser devido a predomínio da família LAM e da linhagem LAM9 pois são os progenitores comuns dessa sublinhagem<sup>3,6,7,8</sup>.

Como demonstrado nesse estudo o *Spoligotyping* não é uma boa ferramenta para diferenciar as famílias Euro Americanas, em populações que predominam as famílias LAM, H e T<sup>7,4,8</sup>. A dificuldade em diferenciar essas famílias se deve ao fato do grande número de cópias IS6110 dessas linhagens produzirem muitas variações nos *locus* DR (*Direct Repeat*) o que origina vários perfis não identificados por essa técnica (presença de *Unknown*) ou com grande grau de homoplasia entre os espaçadores que definem diferentes famílias<sup>13</sup>. Nesse contexto o SNP Ag85C103 se destaca como um marcador específico para identificação da real frequência da família LAM em uma população<sup>2,8</sup>.

Algumas limitações podem ser observadas: os dados clínicos dos pacientes não foram relacionados com o genótipo RD<sup>Rio</sup>; não foi realizado o *Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP IS6110* para identificação de *clusters* e avaliação da transmissão como o RD174; os isolados com resultados divergentes entre o SNP Ag85C103 e o *Spoligotyping* não foram sequenciados.

No estado de Minas Gerais a sublinhagem RD<sup>Rio</sup> foi mais frequente na TB-MDR, nos isolados sensíveis o marcador RD174 predominou, a família LAM e a linhagem LAM9 foram as mais identificadas. Novos estudos para avaliar a virulência e transmissão da TB devem ser realizados no Brasil, assim como vigiar a evolução genética do *M. tuberculosis*.

### **Agradecimentos**

Agradecemos a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ 03266-13/APQ 00094-12) e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq 446796/2014 e 310174/2017-7). Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia da Faculdade de Medicina da UFMG. A Fundação Ezequiel Dias (FUNED). A Rede Brasileira de Tuberculose – REDE TB.



## Referências

- 1 - WHO (2016). *WHO Global Tuberculosis Report*. Available online at: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report.pdf).
- 2 - Weisenberg AS, Gibson AL, Huard RC, Kurepina N, Bang H, Lazzarini LCO, Chiu Y, Li J, Ahuja S, Driscoll J, Kreiswirth BN, Ho JL. Distinct Clinical and Epidemiological Features of Tuberculosis in New York City Caused by the RD<sup>Rio</sup> *Mycobacterium tuberculosis* Sublineage. *Infect Genet Evol* 2012; **12**, 664–670
- 3 - David S, Duarte EL, Leite CQF, Ribeiro JN, Maio JN, Paixão P, Portugal C, Sancho L, Sousa JG. Implication of the RD<sup>Rio</sup> *Mycobacterium tuberculosis* sublineage in multidrug resistant tuberculosis in Portugal. *Infect Genet Evol* 2012. **12**, 1362–1367.
- 4 - Gomes HM, Elias AR, Oelemann MAC, Pereira MAS, Montes FFO, Marsico AG, et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infect Genet Evol* 2012. **12**, 649–656.
- 5 - Reynaud Y, Millet J, Rastogi N. Genetic structuration, demography and evolutionary history of *Mycobacterium tuberculosis* LAM9 sublineage in the Americas as two distinct subpopulations revealed by Bayesian analyses. *PLoS One* 2015. **10**, e0140911.
- 6 - Lazzarini LCO, Huard RC, Boechat NL, Gomes HM, Oelemann MC, Kurepina N, Shashkina E, Mello FQ, Gibson AL, Virginio MJ, Marsico AG, Butler WR, Kreiswirth BN, Suffys PN, Lapa e Silva JR, Ho JL. Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2007; **45**, 3891–3892.
- 7 - Vasconcelos, SEG. Acosta CC, Gomes LL, Conceição EC, Lima KV, Araujo MI, et al. Strain Classification of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Brazil Based on Genotypes Obtained by Spoligotyping, Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit

Typing and the Presence of Large Sequence and Single Nucleotide Polymorphism. *PlosONE* 2014. **9** e107747.

8 - Gibson AL, Huard RC, Gey van Pittius NC, Lazzarini LCO, Driscoll J, Kurepina N, Zozio T, Sola C, Spindola SM, Kritski AL, Fitzgerald D, Kremer K, Mardassi H, Chitale P, Viedma GD, Gicquel B, Pape JW, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Warren RM, van Helden PD, Rastogi N, Suffys PN, Lapa e Silva JR, Ho JL. Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RD<sup>Rio</sup> sublineage of Latin American e Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype family. *J Clin Microbiol* 2008. **46**, 1259-1267.

9 - de Jong BC, Hill PC, Aiken A, Awine T, Antonio M, Adetifa IM, Jackson-Sillah DJ, Fox A, DeRimer K, Gagneux S, Borgdorff MW, McAdam KPWJ, Corrah T, Small PM, Adegbola RA. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *Mycobacterium tuberculosis* lineage in the Gambia. *J Infect Dis* 2008. **198**, 1037–1043.

10 - BRASIL. *Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias*. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica - Ministério da Saúde 2011.

11 - Siddiqi SH, Rüsç-Gerdes S. MGIT<sup>TM</sup> PROCEDURE MANUAL. FindDiagnostics 2006.

12- Dantas NGT, Suffys PN, Carvalho WS, Gomes HM, Almeida IN, Assis LJ, Augusto CJ, Gomgnimbou MK, Refregier G, Sola C, Miranda SS. Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Minas Gerais State, Brazil. *BMC Infectious Diseases* 2015. **15**,306.

13 - Zhang J, Abadia E, Refregier G, Tafaj S, Boschioli ML, Guillard B, Andremont A, Ruimy R, Sola C. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of ‘spoligotyping’ with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *Journal of Medical Microbiology* 2010. **59**, 285–294

14 - Costa ERD, Lazzarini LCO, Perizzolo PF, Díaz CA, Spies FS, Costa LL, Ribeiro AW, Barroco C, Schuh SJ, Pereira MAS, Dias CF, Gomes HM, Unis G, Zaha A, Silva PEA, Suffys PN, Rossetti MLR. *Mycobacterium tuberculosis* of the RD<sup>Rio</sup> Genotype is the Predominant Cause of Tuberculosis and Associated with Multidrug Resistance in Porto Alegre City, South Brazil. *J Clin Microbiol* 2012. **51**,1071-1077.

15 - Gavín P, Iglesias MJ, Jiménez MS, Herrera-León L, Rodríguez-Valín E, Rastogi N, March J, González-Palacios R, Palenque E, Ayarza R, Hurra E, Campos-Herrero I, Vitoria MA, Lezcano MA, Revillo MJ, Martín C, Samper S. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain from Equatorial Guinea detected in Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2009. **15**,1858–1860.

## 5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo do custo do diagnóstico laboratorial da TB é importante para compreender a dinâmica de manutenção da rotina laboratorial assim como da incorporação de novas tecnologias. Vale ressaltar a necessidade de utilizar metodologias que permitem resultados fidedignos com a realidade de cada local, como o custo ABC, para melhorar a gestão de recursos no SUS.

A investigação do *M. tuberculosis* RD<sup>Rio</sup> no estado de Minas Gerais demonstrou que essa sublinhagem é a mais frequente no estado e que tem relação aos casos de TB-MDR. Os resultados obtidos destacam a necessidade da constante realização de estudos de epidemiologia molecular para o conhecimento TB.

## 6.1 PERSPECTIVAS

### 6.1.2 Estudo do Custo do diagnóstico laboratorial da TB

Utilizar as cadeias de custo para calcular o custo médio e ABC de novas metodologias como o Xpert<sup>®</sup>MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, USA), o Genotype<sup>®</sup>MTBDRplus (Hain LifeScienc, Nehren, Germany) e o Kit SIRE Nitratase<sup>®</sup> PlastLabor que poderão ser implementadas no país. Além da avaliação do impacto clínico dessas metodologias (estudo de custo-efetividade).

### 6.1.3 Estudo da Genotipagem do *M. tuberculosis*

Sequenciar cepas do *M. tuberculosis* que apresentaram divergências entre os resultados do PCR-RFLP fbpC103/Ag85C103, *Spoligotyping* e PCR RD<sup>Rio</sup>.

Comparar os resultados do RD174, RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR e verificar a presença desse RD na formação de *clusters*, relacionar com transmissão recente ou tardia e com dados clínicos.

## 7.0 REFERÊNCIAS

Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. (2002). Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* 10: 45–52.

BRASIL (2006). *Ministério da Saúde*. Manual Técnico de Custos – Conceitos e Metodologias. 2006. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Economia e Saúde. Brasília.

BRASIL (2010). *Ministério da Saúde*. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.

BRASIL (2011). *Ministério da Saúde*. Xpert MTB/RIF no diagnóstico da tuberculose pulmonar. *BRATS*. 16, 1-13.

BRASIL (2016). *Ministério da Saúde*. Boletim Epidemiológico. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. 47, 1-15.

Dantas NGT (2015). Avaliação Genética de Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* Resistentes à Fármacos Provenientes do Estado de Minas Gerais. *Universidade Federal de Minas Gerais*.

David S, Duarte EL, Leite CQF, Ribeiro JN, Maio JN, Paixão P, et al (2012). Implication of the RD<sup>Rio</sup> *Mycobacterium tuberculosis* sublineage in multidrug resistant tuberculosis in Portugal. *Infect Genet Evol* 12, 1362–1367.

Dye C, Watt CJ, Bleed D (2002). Low access to a highly effective therapy: a challenge for international tuberculosis control. *Bull World Health Organ*. 80, 437-44.

GIBSON AL, et al. (2008). Application of Sensitive and Specific Molecular Methods To Uncover Global Dissemination of the Major RD<sup>Rio</sup> Sublineage of the Latin

American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotype Family. *J.Clin.Microbiol* 46,1259–1267.

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

LABTEST (2012). DETECT TB – Instruções de Uso. Copyright by LabtestDiagnóstica S.A. Ref: 010713.

Laranjeira, FO, Petramale CA. (2009). A avaliação econômica em saúde na tomada de decisão: a experiência da CONITEC. *Avaliação de Tecnologias de Saúde*. 14,165-170.

Lazzarini LCO., *et al.* (2007). Discovery of a Novel *Mycobacterium tuberculosis* Linage That Is a Major Cause of Tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 45,3891-3902.

Michelon CT, Rosso F, Schmid KB, Sperhacker RD, Oliveira MM, Kritski AL *et al.* (2011). Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz*. 106, 194-199.

Nagdev KJ *et al.* (2010). Determination of polymerase chain reaction efficiency for diagnosis of tuberculous meningitis in Chelex-100<sup>®</sup> extracted DNA samples. *Int J Tuberc Lung Dis*. 14,1032–1038.

Schimid KB, Scherer L, Barcellos RB, Kuhleis D, Prestes IV, Steffen RE *et al.* (2014). Smear plus Detect TB for a sensitive diagnosis of pulmonary tuberculosis: a cost-effectiveness analysis in a incarcerated population. *BMC. Infect. Dis*. 14,678.

Shah M, Chihota V, Coetzee G, Churchyard G, Dorman ES. (2013). 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*. 13,352.

Siddiqi SH, Rüsç-Gerdes S. (2006). MGIT™ PROCEDURE MANUAL. FindDiagnostics.

Sola C, Filliol I, Legrand E, et al. (2003). Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolution genetics. *Infect Genet Evol.* 3,125-133.

Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. (2015) Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults (Review). *Cochrane*.

Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 44,4498–4510.

Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 31,406–409.

Vasconcelos, SEG. *et al.* (2014) Strain Classification of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Brazil Based on Genotypes Obtained by Spoligotyping, Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing and the Presence of Large Sequence and Single Nucleotide Polymorphism. *PlosONE.* 9, e107147.

WHO (2010). *WHO Global Tuberculosis Report*. Available online at: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report.pdf).

WHO (2011). *WHO Global Tuberculosis Report*. Available online at: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report.pdf).

WHO (2015). *WHO Global Tuberculosis Report*. Available online at: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report.pdf).



WHO (2016). *WHO Global Tuberculosis Report*. Available online at: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report.pdf).

Yeboah-Manu D, Asante-Poku A, Bodmer T, Stucki D, Koram K, et al. (2011) Genotypic Diversity and Drug Susceptibility Patterns among *M. tuberculosis* Complex Isolates from South-Western Ghana. *PLoS ONE* 7: e21906

## 8.0 ANEXOS

### 8.1 Anexo A – Folha de Aprovação no Comitê de Ética – Estudo de Custo



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

Projeto: CAAE –11821913.6.0000.5257

Interessado(a): Prof. Afranio Lineu Kritski  
Faculdade de Medicina - UFRJ ((FM/UFRJ))

#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 25 de abril de 2013, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação de novo teste diagnóstico para Tuberculose em diferentes regiões do Brasil." 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.

  
Prof. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG

## 8.2 Anexo B – Folha de Aprovação no Comitê de Ética – Estudo de Genotipagem



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

### 8.3 Anexo C – Folha de Aprovação da Defesa

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL	
---	---	---

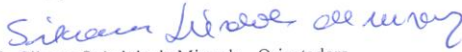
**FOLHA DE APROVAÇÃO**


**"Análise do custo do diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar e  
investigação do Mycobacterium tuberculosis da sublinhagem RDRio no estado  
de Minas Gerais"**

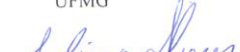
**ISABELA NEVES DE ALMEIDA**

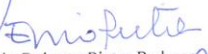
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado como requisito para obtenção  
do grau de Doutor em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS  
DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.


Aprovada em 23 de março de 2017, pela banca constituída pelos membros:


  
 Profa. Silvana Spindola de Miranda - Orientadora  
 UFMG

  
 Profa. Wânia da Silva Carvalho - Coorientadora  
 UFMG

  
 Profa. Juliana Alvares  
 UFMG

  
 Prof. Enio Roberto Pietra Pedrosa  
 UFMG

  
 Dra. Rosângela Siqueira de Oliveira  
 Instituto Adolfo Lutz

  
 Dr. Harrison Magdimer Gomes  
 Fundação Oswaldo Cruz

Belo Horizonte, 23 de março de 2017.