

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas

DISSERTAÇÃO

**ASSOCIAÇÃO DO VALOR LIMIAR DO CICLO DO TESTE *MTB/RIF* COM OS
DESFECHOS DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Matheus de Matto Pires

Porto Alegre, 2020

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas

**ASSOCIAÇÃO DO VALOR LIMIAR DO CICLO DO TESTE *MTB/RIF* COM OS
DESFECHOS DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Matheus de Matto Pires

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Pneumológicas, à Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Pneumológicas

Orientadora: Prof^ª. Dra. Denise Rossato Silva

Porto Alegre, 2020

CIP - Catalogação na Publicação

De Matto Pires, Matheus
Associação do valor limiar do ciclo do teste
MTB/RIF COM OS DESFECHOS DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE
/ Matheus De Matto Pires. -- 2020.
45 f.
Orientadora: Denise Rossato Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre,
BR-RS, 2020.

1. Tuberculose. 2. Biologia Molecular. 3. HIV. 4.
Epidemiologia. I. Rossato Silva, Denise, orient. II.
Título.

“Nos tornamos construtores construindo, harpistas tocando harpa. Da mesma forma, então, nos tornamos juntos praticando ações justas, moderados praticando ações moderadas, corajosos praticando ações corajosas.”

- Aristóteles

AGRADECIMENTOS

Um grande prazer ter sido orientado pela Professora Dr^a Denise Rossato Silva. Sem pestanejar foste crucial no apoio pessoal e técnico que culminaram na conclusão deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório do Laboratório Municipal de Alvorada, Setor de Tisiologia e Secretária da Saúde, pelo apoio em grande parte deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE QUADROS	9
LISTA DE TABELAS	10
1 Introdução	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Tuberculose.....	15
2.1.1 Definição.....	15
2.1.2 Epidemiologia	16
2.1.2.1 Epidemiologia no Mundo	16
2.1.2.3 Epidemiologia no Brasil	16
2.1.2.4 Epidemiologia no Rio Grande do Sul e Porto Alegre	19
2.1.3 Patogênese.....	20
2.1.4 Diagnóstico da Tuberculose.....	22
2.1.4.1 Sinais e Sintomas.....	22
2.1.4.2 Diagnóstico radiológico.....	23
2.1.4.3 Diagnóstico Microbiológico	24
2.1.4.3.1 Baciloscopia	24
2.1.4.3.2 Cultura.....	25
2.1.4.3.3 XPERT MTB/RIF.....	27
3 Justificativa	29

4	Objetivos.....	30
4.1	Objetivo geral.....	30
5.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	34
5.1	Title: Association of Xpert MTB/RIF cycle threshold values with tuberculosis treatment outcomes.....	34
6	CONCLUSÃO	44
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Coeficiente de incidência de novos casos geral e por faixa etária, 2010 a 2019, Brasil	17
Figura 2: Coeficiente estratificado por Estado, Brasil, 2019	18
Figura 3: Coeficiente de mortalidade por tuberculose (100 mil habitantes), Brasil, 2009 a 2018.....	19

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sensibilidade e Especificidade para o teste Xpert® MTB/RIF agrupados segundo diagnóstico bacteriológico (baciloscopia e cultura) e clínico.	13
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Table 1. Characteristics os study patients.....	41
Table 2. Multivariate analisys of the factors associated with non-cure (treatment failure and death).....	41

1 Introdução

A tuberculose (TB) é um importante problema de saúde pública no mundo, particularmente em países de baixa e média renda. Estima-se que um terço da população mundial está infectado pelo *Mycobacterium tuberculosis*(1). O Brasil está em 16º lugar entre os 22 países que coletivamente contribuem para 80% dos casos de TB globalmente, com incidência notificada de 35,5 casos/100.000 habitantes/ano em 2019. Porto Alegre é a quarta capital brasileira com maior número de casos de TB, com uma incidência de 89,9 casos/100.000 habitantes e uma taxa de coinfeção TB-HIV de 16,1%(2).

Para o diagnóstico da TB, a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza que seja utilizada inicialmente a baciloscopia de escarro. A pesquisa do bacilo álcool-ácido-resistente (baciloscopia) é um método de baixo custo e amplamente utilizado em todo o mundo para o diagnóstico da TB (3). Entretanto, essa não é uma técnica sensível, e somente 57% dos novos casos de TB pulmonar notificados em 2010 tinham baciloscopia positiva (1). A sensibilidade da baciloscopia varia de 40 a 80%, dependendo de fatores como o tipo de lesão, o tipo e número de amostras, a atenção e a persistência do microscopista e a presença de co-infecção com HIV (4). O número mínimo de bacilos necessários para produzir um esfregaço com resultado positivo tem sido estimado entre 5.000 a 10.000 por mililitro, o que acarreta uma grande probabilidade da ocorrência de resultados falso-negativos. A negatividade desse método diagnóstico pode ser influenciada tanto pelo estágio inicial da doença, tendo em vista que o bacilo apresenta reprodução lenta, quanto pela imunidade do indivíduo, que pode manter os níveis de infecção sob controle (5).

A cultura para micobactérias tem rendimento diagnóstico superior ao da baciloscopia direta no escarro, porém, por ser consideravelmente mais demorada em seus resultados - cerca de 2 a 8

semanas - é menos prática na rotina diária de atendimento dos casos e para a tomada de decisão terapêutica (6). Dessa forma, muitas vezes o tratamento é realizado empiricamente baseado em critérios clínico-radiológicos e pode resultar em custos e toxicidades desnecessários.

A TB pulmonar com baciloscopia negativa (TPBN) representa 30-60% dos casos de TB, conforme a região (7). No Brasil, 24% a 30% dos casos de TB pulmonar entre os adultos são TPBN (8). A mortalidade desses pacientes pode chegar até 25% em populações com alta prevalência de infecção pelo HIV, o que pode ser em grande parte consequência do atraso no diagnóstico (9). Além disso, embora os pacientes com baciloscopia positiva sejam considerados mais infectantes, 10-20% das transmissões de TB em nível populacional são atribuíveis a casos de TPBN(10).

Considerando-se a demora nos resultados da cultura, o uso de testes diagnósticos mais rápidos, que pudessem autorizar o início do tratamento antes do resultado da cultura, seria extremamente útil. A reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction-PCR*) é uma técnica de amplificação do ácido desoxirribonucleico (DNA) da célula que pode detectar menos de um fragmento do bacilo de Koch (11), sendo um método rápido e confiável para o diagnóstico da TB. Embora tenha alta especificidade, a sensibilidade tem uma ampla variação, de 36% a 97%, dependendo dos resultados da baciloscopia e cultura (12).

O Xpert MTB/RIF é um PCR em tempo real, totalmente automatizado, que detecta o *Mycobacterium tuberculosis* e a resistência à rifampicina em menos de 2 horas, com sensibilidade de 95% e especificidade de 98% em amostras com baciloscopia positiva (13). O teste consiste na purificação, concentração e amplificação de ácidos nucleicos por reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction-PCR*) em tempo real e na identificação de seqüências de ácidos nucleicos no genoma TB (do *M. tuberculosis*), especificamente do gene *rpoβ*. A diferença deste para os demais testes de amplificação de ácidos nucleicos utilizados na detecção de TB é que a plataforma do dispositivo do teste integra e automatiza os três processos (preparação de amostras,

amplificação e detecção), necessários para a PCR em tempo real baseada em testes moleculares (14).

O Xpert MTB/RIF detecta simultaneamente *M. tuberculosis* e a resistência à rifampicina pela amplificação, por meio de PCR, de cinco sondas sobrepostas que são complementares à região determinante da resistência à rifampicina, composta por 81 pares de bases do gene *rpoB* de *M. tuberculosis*. Em seguida, esta região é examinada com o objetivo de identificar mutações associadas à resistência à rifampicina. O processo de amplificação por PCR, neste teste, é *heminested* e o alvo amplificado é detectado em tempo real por fluorescência. Neste processo, dois conjuntos de *primers* são utilizados em duas reações sucessivas. Na primeira PCR, um par de *primers* é usado para gerar produtos de DNA, que podem conter produtos amplificados a partir de áreas não-alvo. Os produtos da primeira PCR são, então, usados como modelo em uma segunda PCR, usando um *primer* diferente, cujo sítio de ligação esteja localizado dentro do primeiro produto amplificado, conseqüentemente, aumentando a especificidade da reação (15).

Em dezembro de 2010, a OMS endossou o uso do Xpert MTB/RIF em países de alta carga de TB, considerando-o uma tecnologia capaz de revolucionar o diagnóstico e o tratamento da doença (1). Evidências clínicas existentes sobre a acurácia e a efetividade do teste Xpert MTB/RIF no diagnóstico da TB pulmonar são provenientes de sete estudos clínicos isolados, publicados em 2010 e 2011. As principais características e resultados dos estudos estão contidos no Quadro 1:

Quadro 1. Sensibilidade e Especificidade para o teste Xpert® MTB/RIF agrupados segundo diagnóstico bacteriológico (baciloscopia e cultura) e clínico.

Resultado Bacteriológico	Estudo	Sensibilidade Xpert® MTB/RIF (IC 95%)	Resultado Bacteriológico e Clínico	Estudo	Especificidade Xpert® MTB/RIF (IC 95%)
Baciloscopia + / Cultura +	Boehme <i>et. al.</i> , 2011	98,3% (97,0-99,0%)	Cultura- / Exame Clínico -	Boehme <i>et. al.</i> , 2011	99,0% (98,5 – 99,3%)
	Rachow A. <i>et. al.</i> , 2011	98,0% (89,6-100%)		Rachow A. <i>et. al.</i> , (2011)	99,0% (94,7 - 100%)
	Marlowe <i>et. al.</i> , 2011	98%	Cultura- / Exame Clínico +	Rachow A. <i>et. al.</i> , (2011)	90,9%
	Helb <i>et. al.</i> , 2010	100% (85,4-100%)			
	Armand <i>et. al.</i> , 2011	100%	Baciloscopia - / Cultura -	Moure <i>et. al.</i> , 2011	100%
Baciloscopia - / Cultura +	Boehme <i>et. al.</i> , 2011	76,9% (72,4-80,8%)	Cultura -	Helb <i>et. al.</i> , 2010	100% (83,4 – 100%)
	Rachow A. <i>et. al.</i> , (2011)	61,1% (35,7-82,7%)		Marlowe <i>et. al.</i> , 2011	95%
	Marlowe <i>et. al.</i> , 2011	72%		Helb <i>et. al.</i> , 2010	100% (65,6 – 100%)
	Moure <i>et. al.</i> , 2011	78,2%		Ioannidis <i>et. al.</i> , 2011	94,3% (80,8% - 99,1%)
	Helb <i>et. al.</i> , 2010	71,7% (57,4-82,8%)		Armand <i>et. al.</i> , 2011	100%
	Armand <i>et. al.</i> , 2011	57%			

Os resultados do teste são gerados automaticamente e relatados como *M. tuberculosis* detectado ou não detectado (com estimativas semi-quantitativas da concentração de *M. tuberculosis* relatadas como baixa, média ou alta) e sensível ou resistente à rifampicina. O teste também fornece o valor do limiar do ciclo (C_T , *cycle threshold*), que reflete o número de ciclos de PCR necessários para detectar o MTB. Cada ciclo representa aproximadamente 50% menos material do que o último, fornecendo assim um resultado semi-quantitativo da carga bacilar, com valor mais altos do C_T refletindo menor carga bacilar (16).

Considerando a recomendação atual da Organização Mundial da Saúde de substituir a baciloscopia pelo Xpert como teste diagnóstico inicial para TB, e que a cultura é demorada em fornecer resultados, o C_T do teste Xpert pode ser a única maneira de avaliar a carga bacilar (17)(18). Além disso, o C_T pode ser usado para identificação dos pacientes mais infectantes e, assim, priorizar a avaliação de contatos (19). Diversos estudos já mostraram que o C_T se correlaciona com a carga bacilar (19), entretanto, a importante questão se o C_T do Xpert prediz a resposta ao tratamento permanece sem resposta.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tuberculose

2.1.1 Definição

A Tuberculose é uma doença infectocontagiosa que irá afetar prioritariamente os pulmões, embora possa estar acometendo outros órgãos e sistemas em sua forma extrapulmonar. A doença é transmitida por aerossóis gerados por um indivíduo que contenham o patógeno do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que compreendem as espécies: *Mycobacterium tuberculosis* dentre outras espécies ou bacilo Koch propriamente dito (1).

2.1.2 Epidemiologia

2.1.2.1 Epidemiologia no Mundo

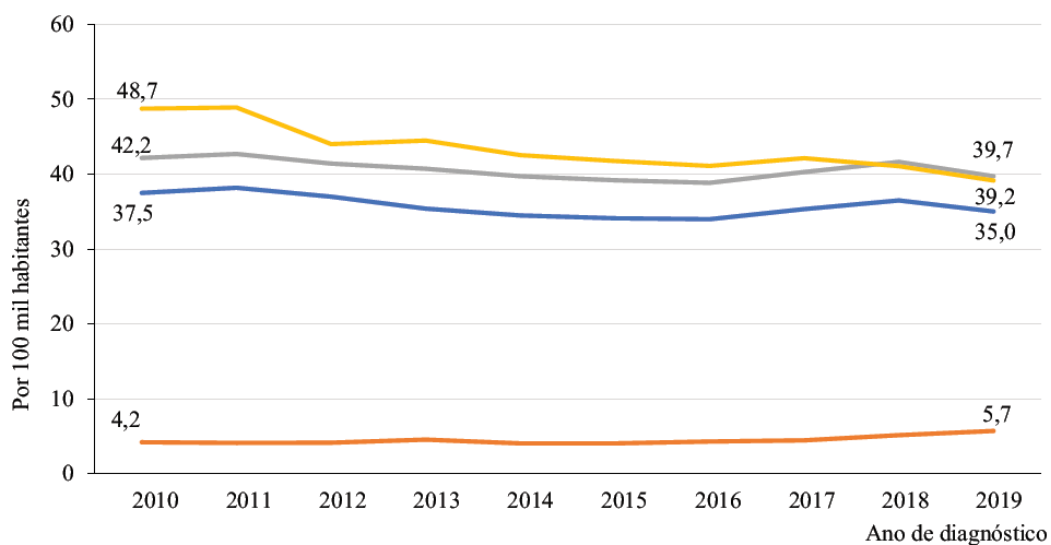
Segundo a OMS, a tuberculose a nível mundial está entre as dez principais causas de morte e em 2018, cerca de 10 milhões de pessoas ficaram doente por tuberculose no mundo e 1,5 milhão de pessoas morreram por consequência da doença, dentre elas, 251 mil pessoas com HIV, sendo a TB a principal causa de morte por um agente infeccioso.

Em 2014 e 2015, todos os membros da Organização das Nações Unidas e Organização Mundial de Saúde, endossaram um documento onde, estabelecem estratégias e protocolos para a redução de 90% das mortes e 80% da taxa de incidência de Tuberculose até o ano de 2030. Para este ano, 2020, estimam que a redução na mortalidade seja de 35% e a incidência dos novos casos de 20% (1).

2.1.2.3 Epidemiologia no Brasil

No Brasil, no ano de 2019, segundo os dados do Ministério da Saúde, foram diagnosticados 73.864 casos novos de tuberculose, o que correspondeu a uma incidência de 35,5 a cada 100 mil habitantes (20).

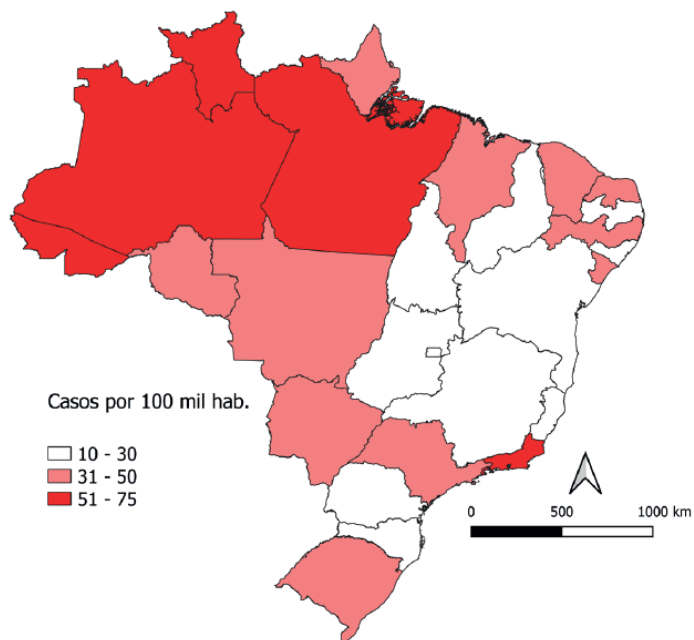
Figura 1: Coeficiente de incidência de novos casos geral e por faixa etária, 2010 a 2019, Brasil



Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Secretarias Estaduais de Saúde/Ministério da Saúde; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Quando estratificado por Estado, o Brasil, demonstra certa heterogeneidade no número de casos e destacam-se os Estados do Rio de Janeiro, Amazonas, Pará, Roraima e Acre, com uma incidência acima de 51 casos a cada 100 mil habitantes, como demonstra a figura 2 (20):

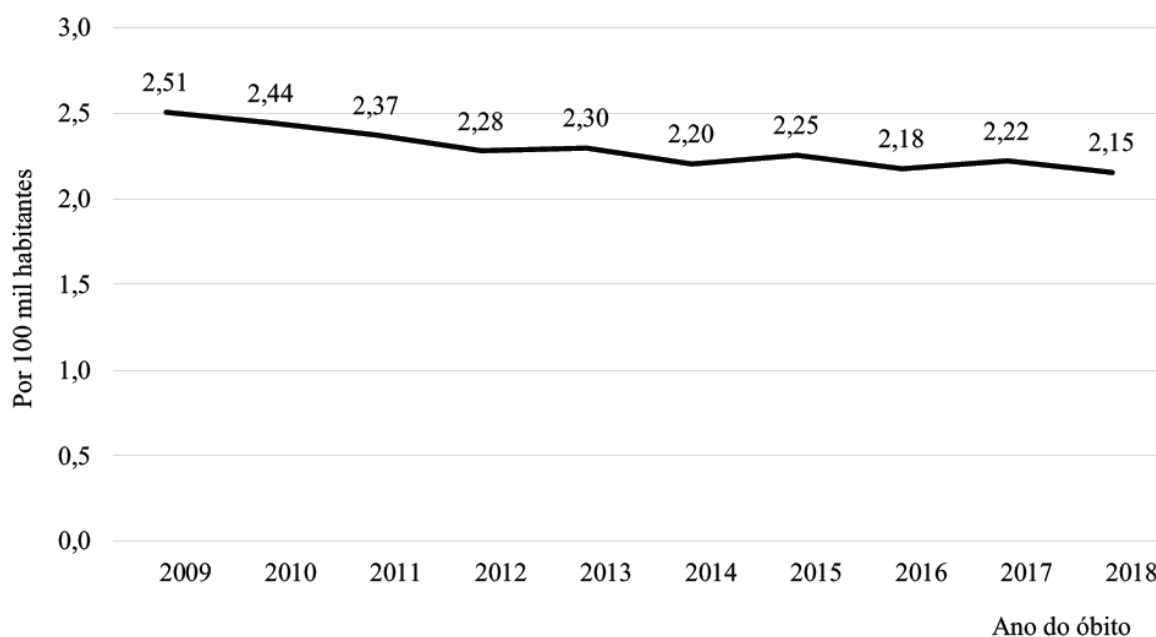
Figura 2: Coeficiente estratificado por Estado, Brasil, 2019



Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Secretarias Estaduais de Saúde/Ministério da Saúde; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Entre os anos de 2009 e 2018, o Brasil, ano a ano, apesar de algumas oscilações, demonstrou uma queda no número de óbitos. Em 2018 no Brasil foram registrados 4490 óbitos por consequência da tuberculose, equivalente a um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos a cada 100 mil habitantes, conforme figura 3 (20):

Figura 3: Coeficiente de mortalidade por tuberculose (100 mil habitantes), Brasil, 2009 a 2018.



Fonte: Sistema de Informação sobre Mortalidade/Ministério da Saúde; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

2.1.2.4 Epidemiologia no Rio Grande do Sul e Porto Alegre

No ano de 2019, no Rio grande do Sul, foram notificados 5224 novos casos de tuberculose, com uma incidência de 46,6 casos a cada 100 mil habitantes, apresentando valor de incidência maior a média nacional (35,5)(21).

O Rio Grande do Sul, possui 20 municípios prioritário para o combate a tuberculose, são eles: Alvorada, Bagé, Cachoeirinha, Canoas, Caxias do Sul, Charqueadas, Gravataí, Guíba, Montenegro, Novo Hamburgo, Passo Fundo, Pelotas, Porto Alegre, Rio Grande, Santa Cruz, Santa Maria, Sapucaia do Sul, São Leopoldo, Uruguaiana, Viamão. Juntos, estes municípios, somaram em 2018, 6049 casos notificados de tuberculose (21).

Porto Alegre é quarta colocada dentre as capitais brasileiras com o maior número de incidência de casos. Em 2018, Porto Alegre obteve 1330 novos casos, com uma incidência de 89,9 a cada 100 mil habitantes (21).

2.1.3 Patogênese

A infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* ocorre através a expiração de aerossóis provocados por tosse, espirro ou fala, contendo núcleos sólidos ou nos núcleos de Wells, contendo uma ou duas micobactérias oriundas de um indivíduo infectado, sem vetores ou intermediários (22).

Após a inalados, devido a grandes processos de evolução do aparelho respiratório, grande parte destes bacilos ficam retidos em barreiras na porta de entrada. Alguns bacilos conseguem escapar desta barreira física e enfrentam outro mecanismo de defesa, o mais importante: fagocitose pelos macrófagos alveolares. Caso consigam o êxito de escaparem desta fase, os bacilos entram em multiplicação e passam a constituir um complexo, chamado de complexo de Gohn, uma espécie de cancro de inoculação, onde a disseminação linfática e inflamação de gânglio regional dão origem ao complexo primário (22).

Durante o processo de fagocitose por macrófagos alveolares, pelos mesmos, são secretadas substâncias que irão induzir uma resposta inflamatória localizada, citocinas e quimiocinas, que induzirão a migração de monócitos da corrente sanguínea para o local de inflamação (4).

Após ser destruído pelo processo de fagocitose por macrófagos e células dendríticas, estas células processam seus componentes e apresentam aos linfócitos seus principais antígenos no contexto de moléculas do complexo de histocompatibilidade tipos I e II. Estas moléculas utilizam,

ainda, na sua apresentação antigênica, importantes moléculas de superfície, denominadas moléculas coestimulatórias, como CD80 e CD86 (23).

Após esta apresentação antigênica, uma sequência de eventos bioquímicos ocorre nos linfócitos como, sua ativação, expansão clonal e secreção de importantes citocinas (IFN- γ), que por consequência irão ativar outros macrófagos, permitindo mais eficácia na eliminação. Os macrófagos, entretanto, possuem uma função não tão nobre assim: armazenar os bacilos e permitirem sua proliferação intracelular, protegendo-os dos mecanismos externos de eliminação, tornando o indivíduo latente ou ao de tuberculose ativa progressiva (23).

Após toda esta apresentação e cascata de eventos biológicos e bioquímicos, nos gânglios linfáticos, ocorre a migração de linfócitos para o local infectado e inicia-se o processo de confecção de uma estrutura chamada de granuloma.

Nos granulomas, os macrófagos voltam a serem ativados pelos linfócitos T através da produção de interferon (INF- γ) e fator de necrose tumoral (TNF – α) onde, estas citocinas, possuem a função de contenção do *Mycobacterium tuberculosis*. Esta estrutura, o granuloma, é caracterizada por níveis baixos de O₂, pH e nutrientes que, irão restringir a multiplicação bacilar acarretando período e estabelecido como latência. Estes granulomas podem persistir por anos no indivíduo e caso ele esteja imunocompetente, o granuloma poderá conter de forma eficiente a infecção. Cerca de 90% dos indivíduos infectados, conseguem controlar de forma positiva a doença, sendo assintomáticos. Nesta fase de latência, há um equilíbrio entre hospedeiro e patógeno, entretanto, cerca de 5% dos indivíduos irão desenvolver uma doença progressiva e potencialmente fatal (23)(24).

Em alguns casos, onde o indivíduo possui algum desarranjo do seu sistema imune devido a infecção pelo HIV, má nutrição, envelhecimento ou qualquer outro tipo de imunossupressão, ocorre a reativação ou tuberculose secundária. A estrutura inicial que armazenava os bacilos e os mantinha em latência, perde esta capacidade de contenção favorecendo a capacidade de replicação

e disseminação da doença conseqüentemente. Esta forma de cooperar entre macrófagos e linfócitos, funciona como um elemento chave na infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e nada exemplifica melhor que a susceptibilidade de portadores de HIV à tuberculose, devido a esta má funcionalidade dos linfócitos T, especificamente CD⁺.

Com a secreção de substâncias citolíticas dos linfócitos T, os macrófagos lisados, liberam os bacilos para que outros macrófagos funcionais possam fazer a fagocitose. Neste processo, pode ocorrer a transferência de bacilos para a corrente sanguínea, onde poderão acometer outros órgãos ou, ainda, acometer vias aéreas onde podem ser expelidas pelos pulmões, tornando aquele indivíduo infectante (23)(24).

2.1.4 Diagnóstico da Tuberculose

2.1.4.1 Sinais e Sintomas

A tuberculose pode apresentar diversos sinais sintomas, porém existem alguns comumente encontrados, dentre eles, abaixo listados:

- Tosse
- Sudorese noturna
- Febre
- Emagrecimento
- Hemoptise
- Imunosupressão de qualquer causa

- Expectoração
- Dor torácica
- Histórico prévio de TB

A tuberculose pode acometer diversos órgãos e sistemas porém, a apresentação na forma pulmonar é a mais frequente encontrada e é também a mais relevante para todo o sistema de saúde pública pois, é nesta forma que, se mantém toda a cadeia de transmissão da doença dificultando no controle dela (25).

No Brasil, a busca pelo diagnóstico inicial da tuberculose, é aplicado de modo simples. O rastreamento inicial se dá quando o indivíduo apresenta tosse persistente por 3 ou mais semanas e é indicado para realização da baciloscopia ou o teste rápido molecular (25).

2.1.4.2 Diagnóstico radiológico

A radiografia de tórax é o meio de escolha inicial para diagnóstico de tuberculose por imagem pois, além de auxiliar no diagnóstico, é possível acompanhamento deste paciente. A tuberculose, em sua forma primária, pode apresentar radiografia de tórax normal onde, apenas pequenos nódulos podem estar presentes, porém, não sendo passíveis de visualização (23).

A alteração mais comumente encontrada nesta apresentação é a linfonomegalia do mediastino com uma taxa de incidência maior em crianças a adultos enquanto o colapso do tecido pulmonar (atelectasia) ocorre em menor frequência. A tuberculose miliar é se caracteriza pela opacidade dos retículos-micronodulares difusos por consequência da difusão hematogênica do *Mycobacterium tuberculosis* pelo parênquima pulmonar. Na fase pós-primária, surgem cavitações frequentemente encontradas nos segmentos ápico-posteriores dos lobos superiores ou nos

segmentos superiores dos lobos inferiores. A fase aguda da doença é caracterizada por paredes de cavitações mais espessas. Nos pacientes considerados curados, encontram-se os tuberculomas, nódulos ou massas pulmonares associadas ou não a nódulos satélites ou gânglios que se calcificam no mediastin (23).

A radiografia de tórax não é recomendada pelo Ministério da Saúde para acompanhamento de resposta ao tratamento por conta de sua imprecisão diagnóstica, porém, é um exame capaz de determinar o grau de acometimento pulmonar secundário à tuberculose e, ainda, pode ser solicitado em unidades básicas de saúde. A priori, a radiografia de tórax pode vir a contribuir para a comparação com o exame prévio e a avaliação ao final do tratamento (26).

2.1.4.3 Diagnóstico Microbiológico

2.1.4.3.1 Baciloscopia

A baciloscopia ou pesquisa de BAAR (bacilo álcool-ácido resistente) é técnica de diagnóstico na qual se pesquisa o bacilo em um esfregaço de amostra clínica, preparado e corado com metodologia estabelecida e padronizada. Apesar dos avanços em meios de diagnósticos, a baciloscopia é amplamente utilizada pois, é um técnica simples e que pode ser implementada de forma facilitada com baixo custo e, ainda, podendo detectar amostras bacilíferas, ou seja, amostras na qual indivíduos são infectantes (3).

O método de Ziehl-Neelsen, permite a visualização bacilar na amostra. Após a realização de um esfregaço com a amostra clínica, cora-se com a lâmina com fucsina de Ziehl-Neelsen, posteriormente descorada com álcool-ácido e, ao final, contracorada com azul de metileno. Devido a alta concentração de lipídeos na parede celular bacteriana, os bacilos, quando expostos a

descoloração com álcool-ácido, não perdem a coloração, permanecendo com a cor rosa. Os bacilos são quantificados em lâmina seguindo critérios estabelecidos e, segundo o Manual de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, são classificados e semi-quantificados da seguinte maneira: : (1) quando não observados BAAR em 100 campos examinados, reporta-se “negativo”; (2) quando são visualizados de um a nove BAAR em 100 campos analisados, relatar a quantidade encontrada em 100 campos; (3) quando são encontrados 10 a 99 BAAR em 100 campos, reporta-se “positivo (+)”; (4) quando são observados em média um a dez BAAR por campo nos primeiros 50 campos, relata-se “positivo (++)”; e (5) quando são encontrados em média mais de 10 BAAR por campo nos primeiros 20 campos, relata-se “positivo (+++)”. Para as demais amostras biológicas, reporta-se apenas “positivo” ao encontrar BAAR ou “negativo” na ausência de BAAR (3).

2.1.4.3.2 Cultura

A cultura para o MTB é um método que possui alta especificidade e sensibilidade e em pacientes com baciloscopia negativa, a cultura de escarro pode elevar em até 30% a positividade, sendo assim, considerada padrão ouro para o diagnóstico da TB (27).

Esta técnica permite a multiplicação em e o isolamento de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), a partir da semeadura de amostra clínica em meios de cultura específicos para micobactérias e o limite de detecção é de 100 bacilos por mililitro de escarro, porém, quando realizada com alta qualidade de técnica, esta sensibilidade, pode ficar, entre 10 e 100 bacilos cultiváveis por mililitro de escarro (3).

A cultura possui alguns critérios de recomendação e, de acordo com a ANVISA (BRASIL, 2008), e são eles: 1) indivíduos sintomáticos com suspeita de TB devido ao longo período de

presença de sintomas sugestivos e exames radiológicos juntamente com a baciloscopia negativa; 2) casos suspeitos de TB onde a quantidade bacilar amostral seja insuficiente para a detecção por baciloscopia e nos casos de TB extrapulmonar; 3) suspeitos de infecção por causadas por micobactérias não causadoras de tuberculose para que seja a identificação da espécie; 4) pacientes que com tratamento prévio já realizado; 5) todos os pacientes em imunossupressão, principalmente portadores de HIV, visando a identificação da espécie e conseqüentemente provas de susceptibilidade aos antimicrobianos (3).

Na etapa inicial, as sofrem um pré-tratamento, onde amostras que não escarro como, urina, líquido e outros líquidos biológicos, passam por uma centrifugação. Tecidos são macerados em partes menores. Após ocorre a fluidificação e descontaminação de amostras não estéreis, como escarro, urina, secreções, lavados sejam brônquicos ou gástricos e fragmentos cutâneos. Para amostras de sítio estéril como, líquido, medula óssea e sangue, por exemplo, não há necessidade de descontaminação. Nesta fase, os agentes químicos utilizados para fluidificar e descontaminar as amostras são o hidróxido de sódio, N-acetil-L-cisteína (NAIC) e ácido oxálico (3).

Após as fases iniciais de pré-tratamento e descontaminação, inicia-se a fase de semeadura onde, as amostras já tratadas são semeadas em meios sólidos que possuem em sua base ovo ou ágar. Os comumente utilizados na rotina laboratorial são os meios Lowenstein-Jensen e Ogawa-Kudow. Estes meios são a base de ovo e utilizam um corante, verde de malaquita, que irá inibir contaminantes. Meios a base de ágar que são utilizados são o Middlebrook 7H10 e Middlebrook 7H11. Por serem transparentes, estes meios permitem a visualização das colônias precocemente. Laboratórios maiores ou grandes centros de referência, possuem ainda, meios líquidos. Estes meios são enriquecidos com aditivos e antibióticos portanto, são indicados, para amostras com escassez de bacilos e, ainda, possuem leitura automatizada de positividade (3).

Realizado a semeadura em meios elegidos, ocorre a incubação deles. A temperatura ideal para o crescimento de micobactérias é de 35-37°C. Os meios permanecem incubados por até 8

semanas devido ao comportamento fastidioso deste microrganismo e após, realiza-se a etapa de leitura e avaliação das placas e/ou meios de crescimento. As colônias são avaliadas quanto a sua morfologia, aspecto (lisa ou rugosa) e se houve ou não contaminação do meio. Semana a semana os tubos de isolamento devem ser avaliados para acompanhamento do crescimento e na ausência de qualquer estrutura sugestiva de TB, incubar novamente. A leitura de meios sólidos é semi-quantificada com os seguintes critérios: “cultura negativa” quando não houver crescimento de colônias; “cultura positiva” quando houver menos de 20 colônias; “cultura positiva (+)” quando houver entre 20 e 100 colônias; “cultura positiva (++)” quando houver mais de 100 colônias espaçadas entre elas; “cultura positiva (+++)” quando houver formação de um “tapete” e não seja possível conta-las (3).

2.1.4.3.3 XPERT MTB/RIF

O teste rápido molecular Xpert® MTB/RIF é uma técnica de reação da cadeia da polimerase (PCR) em tempo real que irá detectar o *Mycobacterium tuberculosis* através da amplificação dos ácidos nucleicos presentes na amostra e simultaneamente a resistência a rifampicina em um intervalo de 2 horas com uma sensibilidade de 95% e especificidade de 98% nas amostras onde a baciloscopia é positiva (13).

A amplificação ocorre através de 5 sondas sobrepostas que são complementares a região determinante da que confere resistência a rifampicina, composta por 81 pares de bases do gene *rpoB* do *Mycobacterium tuberculosis*. Em biologia molecular existem diversas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos mas, na presente, a técnica implementada é a *heminested* na qual, o alvo é amplificado, neste caso o *Mycobacterium tuberculosis*, por fluorescência e a partir deste primeiro produto de detecção são utilizados em uma segunda reação, utilizando um *primer* diferente para aumentar a especificidade da reação (11).

Para iniciar a execução do teste, as amostras são tratadas com NAOH e isopropanol, que irá reduzir de forma significativa os riscos biológicos pois, diminui a viabilidade do *Mycobacterium tuberculosis* por, no menos, seis logs (10^6 o número de patógenos viáveis). Após tratada, de forma manual é transferida ao cartucho que o fabricante oferece, de uso único e já previamente carregado com todos os componentes utilizados na reação. O cartucho então é inserido no equipamento automatizado que irá realizar a extração e a amplificação do material genético. Os resultados são gerados automaticamente na interface do software e relatados como *Mycobacterium tuberculosis* DETECTADO ou NÃO DETECTADO e, ainda, com estimativas semi-quantitativas da concentração bacilar presente naquela amostra que são relatadas como baixa, média ou alta e, ainda, sensível ou não a rifampicina (8).

3 Justificativa

Como a Organização Mundial da Saúde estabelece que seja substituída a baciloscopia de escarro pelo teste rápido molecular do GeneXpert, a utilização dos valores limiares dos ciclos de cada PCR, pode vir a ser uma ferramenta extremamente útil para semi-quantificar a carga bacilar de cada proveniente de indivíduo, classificando-os em mais infectante ou menos e, ainda, podendo prever possíveis desfechos clínicos desfavoráveis ou favoráveis para cada paciente, sendo assim sendo uma ferramenta aliada para o corpo clínico adotar condutas mais eficazes e em menor tempo.

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar a associação dos valores do limiar do ciclo do teste *MTB/rif* com os desfechos do tratamento da tuberculose.

4.2 Objetivos específicos

1. Comparar os valores do limiar do ciclo do teste *Mtb/rif* em pacientes curados e não-curados.
2. Avaliar, em análise multivariada, se os valores do limiar do ciclo do teste estão independentemente associados com os desfechos do tratamento.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. ARE UPDATED EVERY YEAR . FOR THE TUBERCULOSIS [Internet]. 2020. Available from: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. Informe Epidemiológico : Tuberculose 2020 Programa Estadual de Controle da Tuberculose – PECT / RS Centro Estadual de Vigilância em Saúde Hospital Sanatório Partenon Março 2020. 2020;
3. Brasil. Manual Nacional de VIGILÂNCIA LABORATORIAL da TUBERCULOSE e outras MICOBACTÉRIAS. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2008. 265–285 p.
4. World TA, Of F. Actions for Life. World Health.
5. Ferreira AA de A, Queiroz KC de S, Torres KP, Ferreira MÂF, Accioly H, Alves M do SCF. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. *Rev Bras Epidemiol*. 2005;8(2):142–9.
6. Conde MB, Melo FAF de, Marques AMC, Cardoso NC, Pinheiro VGF, Dalcin P de TR, et al. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. *J Bras Pneumol*. 2009 Oct;35(10):1018–48.
7. Recommendations for HIV-prevalent and resource-constrained settings.
8. Brasil. Manual de recomendações. 2011. 288 p.
9. Getahun H, Harrington M, O’Brien R, Nunn P. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes. *Lancet (London, England)*. 2007 Jun;369(9578):2042–9.
10. Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, et al. Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet (London, England)*. 1999 Feb;353(9151):444–9.
11. Tueller C, Chhajed PN, Buitrago-Tellez C, Frei R, Frey M, Tamm M. Value of smear and PCR in bronchoalveolar lavage fluid in culture positive pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J*. 2005;26(5):767–72.
12. Wong CF, Yew WW, Chan CY, Au LY, Cheung SW, Cheng AF. Rapid diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis via fiberoptic bronchoscopy: utility of polymerase chain reaction in bronchial aspirates as an adjunct to transbronchial biopsies. *Respir Med*. 1998

- Jun;92(6):815–9.
13. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *N Engl J Med*. 2010;363(11):1005–20.
 14. Rie A Van, Page-Shipp L, Scott L, Sanne I, Stevens W. Xpert ® MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: Hype or hope? *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10(7):937–46.
 15. Moore DAJ, Roper MH. Diagnosis of smear-negative tuberculosis in people with HIV/AIDS. Vol. 370, *Lancet* (London, England). England; 2007. p. 1033–4.
 16. Anvisa. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. *Bol Bras Avaliação Tecnol em Saúde*. 2008;(6):1–13.
 17. Organization WH. Automated real-time nucleic acid amplification technology for simultaneous and rapid detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF. Policy statement WHO/HTM/TB/20114 Geneva, ... [Internet]. 2011; Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Automated+Real-time+Nucleic+Acid+Amplification+Technology+for+Rapid+and+Simultaneous+Detection+of+Tuberculosis+and+Rifampicin+Resistance+:+Xpert+MTB+/+RIF+System#0>
 18. Hanrahan CF, Theron G, Bassett J, Dheda K, Scott L, Stevens W, et al. Xpert MTB/RIF as a measure of sputum bacillary burden: Variation by HIV status and immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(11):1426–34.
 19. Lange B, Khan P, Kalmambetova G, Al-Darraji HA, Alland D, Antonenka U, et al. Diagnostic accuracy of the Xpert® MTB/RIF cycle threshold level to predict smear positivity: A meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2017;21(5):493–502.
 20. BRASIL. Boletim Epidemiológico de Tuberculose. Ministério da Saúde Secr Vigilância em Saúde Dep Doenças Condições Crônicas e Infecções Sex Transm. 2020;1:40.
 21. Sanitaria V. Informe Epidemiológico : Tuberculose 2020 Programa Estadual de Controle da Tuberculose – PECT / RS Centro Estadual de Vigilância em Saúde Hospital Sanatório Partenon Março 2020. 2020;
 22. Lapa Silva JR. Novos Aspectos da Patogenia da Tuberculose The Pathogenesis of Tuberculosis: Novel Aspects. *Pulmão RJ* [Internet]. 2012;21(1):10–4. Available from: http://www.sopterj.com.br/wp-content/themes/_sopterj_redesign_2017/_revista/2012/n_01/03.pdf
 23. BOMBARDA S, FIGUEIREDO CM, FUNARI MBDG, SOARES JÚNIOR J, SEISCENTO M, TERRA FILHO M. Imagem em tuberculose pulmonar. *J Pneumol*. 2001;27(6):329–40.
 24. Capone D, Jansen JM, Lopes AJ, Do C, Sant 'anna C, Soares MO, et al. Diagnóstico por imagem da tuberculose pulmonar. Diagnosis for image of the pulmonary tuberculosis. *Pulmão RJ*. 2006;15(3):166–74.
 25. Brasil. Manual de para o Controle da Tuberculose [Internet]. Ministério da Saúde. 2019. 364 p. Available from: https://www.telelab.aids.gov.br/index.php/biblioteca-telelab/item/download/172_d411f15deeb01f23d9a556619ae965c9
 26. Cruz RDCS, De Albuquerque MDFPM, Campelo ARL, E Silva EJDC, Mazza E, Menezes

- RC, et al. Tuberculose pulmonar: Associação entre extensão de lesão pulmonar residual e alteração da função pulmonar. *Rev Assoc Med Bras.* 2008;54(5):406–10.
27. Costa RR da, Silva MR, Gonçalves IC. Diagnóstico laboratorial da tuberculose: Revisão de literatura. *Rev Med Minas Gerais.* 2018;28(Supl 5):197–206.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

5.1 Title: Association of Xpert MTB/RIF cycle threshold values with tuberculosis treatment outcomes.

Authors: Matheus de Matto Pires¹, Giovana Rodrigues Pereira^{1,2}, Márcia Silva Barbosa^{1,2}, Natan José Dutra Dias², Carina Secchi², Jociane Saldanha Hoff², Denise Rossato Silva^{1,3}.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

²Laboratório Municipal de Alvorada, Alvorada, Brazil.

³Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Denise Rossato Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – 2350 Ramiro Barcelos Street, room 2050, postal code 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55 51 33598241, Fax: +55 51 33598000. Email: denise.rossato@terra.com.br.

ABSTRACT

Introduction: Considering the current recommendation of the World Health Organization to replace sputum smear microscopy with Xpert MTB/RIF as an initial diagnostic test for tuberculosis (TB), and that culture takes time to provide results, the cycle threshold (C_T) of the Xpert test may be the only way to assess bacillary load. The objective of this study is to evaluate the association of bacillary load, measure by the Xpert C_T value, with the outcomes of TB treatment. **Methods:** Cohort study. Xpert C_T values were evaluated in cured and non-cured (failure and death) patients. Multivariate analysis was performed to evaluate if C_T value is independently associated with TB treatment outcomes. **Results:** During the study period, 155 patients (84 cured and 71 non-cured) met the inclusion and were included in the analysis. The mean C_T value for Xpert MTB/RIF test was 20.7 ± 5.6 in cured patients and 17.1 ± 5.6 in non-cured patients ($p < 0.0001$). Previous TB was more frequent in non-cured (28.2%) than in cured patients (7.1%) ($p < 0.0001$). Non-cured patients were younger than cured ones (37.1 ± 13.3 vs 43.6 ± 16.2 ; $p = 0.006$). HIV was more frequent in non-cured (28.2%) than in cured patients (15.5%), although this difference was not statistically significant ($p = 0.054$). In multivariate analysis, C_T values, age, previous TB, and HIV were independently associated with non-cure. **Conclusions:** Lower Xpert MTB/RIF C_T values were independently associated with worse treatment outcomes. The information from even a single test performed before starting treatment proved to be a relatively good predictor of TB treatment outcome.

Keywords: tuberculosis; diagnosis; Xpert MTB/RIF; cycle threshold; *Mycobacterium tuberculosis*; molecular test

INTRODUCTION

In December 2010, the World Health Organization (WHO) endorsed the use of Xpert MTB/RIF in countries with a high tuberculosis (TB) load, considering it a technology capable of revolutionizing the diagnosis and treatment of the disease (28). Xpert MTB/RIF is a real-time, fully automated PCR that detects *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and resistance to rifampicin in less than 2 hours, with a sensitivity of 95% and a specificity of 98% in samples with positive sputum smear microscopy (13). The test results are automatically generated and reported as detected or undetected MTB (with semi-quantitative estimates of the concentration of MTB reported as low, medium or high) and sensitive or resistant to rifampicin. The test also provides the cycle threshold (C_T) value, which reflects the number of PCR cycles required to detect MTB. Each cycle represents approximately 50% less material than the last, thus providing a semi-quantitative result of the bacillary load, with higher C_T values reflecting less bacillary load (29).

Considering the current recommendation of the WHO to replace sputum smear microscopy with Xpert as an initial diagnostic test for TB, and that culture takes time to provide results, the C_T of the Xpert test may be the only way to assess bacillary load (18,19,30,31). In addition, the C_T can be used to identify the most infectious patients and, thus, prioritize the evaluation of contacts (19). Several studies have already shown that C_T correlates with bacillary load (18,19,31); however, the important question of whether Xpert C_T predicts response to treatment remains unanswered. Therefore, the objective of this study is to evaluate the association of the C_T value of the Xpert MTB/RIF test with the outcomes of TB treatment.

METHODS

Study design and location

We conducted a cohort study in an outpatient TB clinic in Alvorada, RS, Brazil. Alvorada is a city in the metropolitan area of Porto Alegre, which has a TB incidence of 84.4 cases/100,000 inhabitants (32). The study was approved by the Ethics Committee in January 15th, 2016 (number 160063).

Patients

Patients aged > 18 years with respiratory symptoms suggestive of pulmonary TB, like productive cough for > 2 weeks, cough of any duration accompanied by constitutional symptoms (fever, weight loss, night sweats) or hemoptysis, who were able to collect a sputum sample were included in the study. Patients who were unable to collect a sputum sample and those with extrapulmonary TB were excluded from this study. Pulmonary TB was diagnosed according to the Brazilian Guidelines for Tuberculosis (6).

Data collection

The following data were collected using a standardized data extraction tool: demographic data (sex, age, race), symptoms, presence of comorbidities, like human immunodeficiency virus (HIV) infection, and treatment outcome (cure or non-cure [failure or death]). Chest X-rays (CXRs) were classified as typical of TB (the presence of nodular, alveolar, or interstitial infiltrates

predominantly affecting the zones above the clavicles or upper zones; the presence of cavitation affecting the upper zones or the apical segment of the lower lobe), or compatible with TB (enlarged hilar nodes, pneumonic lesion, atelectasis, mass lesion, miliary), according to previously described guidelines (33).

Sputum smears were stained by Ziehl-Neelsen (ZN) staining technique for the detection of AFB, and culture was performed using the Ogawa-Kudoh method. Xpert MTB/RIF test was performed according to the manufacturer's directions (29). The results are generated automatically on the screen and reported as MTB detected or not detected (with semi-quantitative estimates of MTB concentration reported as low, medium or high) and susceptible or resistant to rifampicin. The C_T will also be recorded.

Statistical analysis

Data analysis was performed using SPSS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Illinois). We included in the analysis only patients with treatment outcomes cure, failure and death; patients with treatment dropout were excluded from the analysis, since the objective of the study was to evaluate if bacillary load (C_T) has an association with poor treatment outcomes, like failure and death. Data were presented as number of cases, mean \pm standard deviation (SD), or median with interquartile range (IQR). Categorical comparisons were performed by chi-square test using Yates's correction if indicated or by Fisher's exact test. Continuous variables were compared using the *t*-test or Wilcoxon test. Multivariate logistic regression analysis was performed to evaluate if C_T value is independently associated with non-cure. Hierarchical logistic regression models with predictors added one at a time were also examined to evaluate the possible collinearity among the predictors. The predictors selected in the final model were based on both numerical and clinical significance. The goodness of fit of the multiple logistic regression models was assessed

using the Hosmer-Lemeshow test. Odds ratios (ORs) and nominal 95% confidence intervals (CIs) were presented. A two-sided p value < 0.05 was considered significant for all analyses.

In order to calculate the sample size, as there are no previous studies evaluating the association of C_T values with TB treatment outcomes, we considered a difference of 5 between the C_T values of cured patients and the C_T values of non-cured patients (failure and death). Thus, considering an alpha error of 0.05, a beta error of 0.20 and an amplitude of the confidence interval of 0.10, 63 patients will be needed per group (cured and non-cured).

RESULTS

During the study period, 155 patients (84 cured and 71 non-cured) met the inclusion and were included in the analysis. The characteristics of the study population are shown in Table 1. The mean age was 43.6 ± 16.2 years in cured patients and 37.1 ± 13.3 in non-cured patients ($p=0.006$). Previous TB was more frequent in non-cured (28.2%) than in cured patients (7.1%) ($p<0.0001$). All patients were smear and culture positive. HIV was more frequent in non-cured (28.2%) than in cured patients (15.5%), although this difference was not statistically significant ($p=0.054$).

The mean C_T value for Xpert MTB/RIF test was 20.7 ± 5.6 in cured patients and 17.1 ± 5.6 in non-cured patients, a difference statistically significant ($p<0.0001$). Multivariate logistic regression analysis performed to evaluate if C_T value is independently associated with non-cure is shown in Table 2. We used factors associated ($p \leq 0.05$) with cure in univariate analysis: age, previous TB, and C_T . HIV was also included as it was almost statistically significant in univariate analysis ($p=0.054$) and because HIV could be a possible confounding factor. The models with or without HIV gave similar results.

Table 1. Characteristics of study patients.

Characteristics	Cured	Non-cured	p Value
Demographic characteristics			
Age, yr	43.6 ± 16.2	37.1 ±	0.006
Male sex	64 (76.2)	48 (67.6)	0.234
White race	62 (73.8)	44(62.0)	0.114
Symptoms			
Cough	80 (95.2)	68 (95.8)	0.999
Weight loss	63 (75.0)	53 (74.6)	0.960
Dyspnea	32 (38.1)	33 (46.5)	0.292
Fever	37 (44.0)	39 (54.9)	0.177
Night sweats	59 (70.2)	41 (57.7)	0.105
Hemoptysis	8 (9.5)	6 (8.5)	0.816
HIV positive	13 (15.5)	20 (28.2)	0.054
Previous TB	6 (7.1)	20 (28.2)	< 0.0001
Radiographic patterns			
Typical of TB	60 (71.4)	45 (63.4)	0.286
Compatible with TB	24 (28.6)	26 (36.6)	0.286
Xpert MTB/RIF C_T, mean ± SD	20.7 ± 5.6	17.1 ± 5.6	< 0.0001

*Data are presented as mean ± SD, or n (%): number of cases with characteristic/total number of cases (percentage). HIV: human immunodeficiency virus; TB: tuberculosis; MTB: Mycobacterium tuberculosis. RIF: rifampicin.

Table 2. Multivariate analysis of the factors associated with non-cure (treatment failure and death).

Variable	OR	95% CI	P Value
Age	0.962	0.938-0.987	0.003
HIV	2.912	1.153-7.354	0.024
Previous TB	6.625	2.131-20.593	0.001
Xpert MTB/RIF C_T	0.859	0.799-0.923	< 0.0001

DISCUSSION

In this cohort study, we evaluated the potential of Xpert MTB/RIF C_T value as a predictor of treatment outcome. We found that non-cured patients had lower C_T values (higher bacillary load) than cured patients. In multivariate analysis, Xpert MTB/RIF C_T value was independently associated with non-cure. In addition, age, previous TB, and HIV were also associated with non-cure in logistic regression model.

The bacillary burden of TB, measured by sputum smear and/or culture has been used as a predictor of transmission risk, disease severity, and worse treatment outcomes (34–37). However, *culture is time-consuming in its results – the turn-around time is about 2-8 weeks, and sputum smear microscopy has been replaced with Xpert MTB/RIF as initial diagnostic test.* In this sense, Xpert MTB/RIF C_T values have been used are a measure of sputum mycobacterial burden (18,19,30,31). We demonstrated in the present study that Xpert MTB/RIF C_T values were independently associated with non-cure (failure and death). In a previous study (38), the authors evaluated the potential use of Xpert MTB/RIF assay as a biomarker to predict treatment outcomes. They found that a combined measure of baseline C_T plus either Delta C_T or a novel “percent closing of baseline C_T deficit” improved the classification of treatment failure status. Nonetheless, they evaluated only eight treatment failures and only HIV negative patients. We have a larger sample size (71 non-cured patients) and included both HIV negative and positive patients.

HIV infection was also associated with worse treatment outcomes in this study. TB remains the leading cause of death among persons with HIV infection, and HIV is associated with significantly increased likelihood of mortality and lower cure rates. In fact, several studies have found a lower TB treatment success rate among co-infected patients (28,39–41). We also found

that younger patients were more frequently non-cured as compared to older ones. Age as a mortality predictor may vary by country. In high-income countries, advancing age is a risk factor for mortality among TB patients (42–44). In low- and middle-income countries, such as Brazil, there is a higher TB mortality in younger patients (45–47). In accordance with our findings, Kolappan et al (45) evaluated 2674 patients in a retrospective cohort study in South India, and found that younger age was a risk factor for TB mortality.

The non-cured patients had more history of previous TB compared with cured patients in the present study. Indeed, previous TB treatment is a known risk factor for treatment failure and mortality (48–50). In a retrospective study (48) conducted in a referral center in Iran, with 715 registered TB patients, the authors found that a history of previous TB was associated with 6.8 times higher risk of mortality.

One limitation of this study is that we recruited patients from a single outpatient TB clinic. However, we believe the results may apply to other settings. In spite of this concern, we showed in a larger sample size than previous studies, and including both HIV positive and negative patients, that Xpert MTB/RIF C_T values are associated with non-cure outcomes (failure and death).

In summary, lower Xpert MTB/RIF C_T values were independently associated with worse treatment outcomes. In a multivariate logistic regression model, age, previous TB, and HIV were also associated with non-cure. This study demonstrated that the information from even a single test performed before starting treatment proved to be a relatively good predictor of TB treatment outcome.

6 CONCLUSÃO

Nesse presente estudo, foi evidenciado que valores mais baixos do CT do Xpert MTB/RIF foram independentemente associados a piores resultados de tratamento. Em um modelo de regressão logística multivariada, idade, TB prévia e HIV também foram associados à não-cura.

Assim, conseguimos demonstrar que a avaliação e utilização dos valores do ciclo limiar do teste (C_t) MTB/RIF pode vir a ser uma ferramenta importante, sendo independentemente associada a fatores inerentes do indivíduo ou qualquer outra variável externa para prever os desfechos clínicos do tratamento da tuberculose e acompanhamento do paciente.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prática da utilização desta ferramenta adicional que o teste Xpert MTB/RIF proporciona é de grande valia uma vez que, a substituição da baciloscopia pelo Xpert é preconizada pela Organização Mundial da Saúde. Assim, essa pode ser a única ferramenta para determinação da carga bacilar do paciente, diminuindo interferentes externos como, subjetividade analítica do profissional, além da especificidade e sensibilidade aliados à agilidade com que se obtém o resultado. Além disso, as informações de um único teste realizado antes de iniciar o tratamento provaram ser um preditor relativamente bom do resultado do tratamento da TB.