



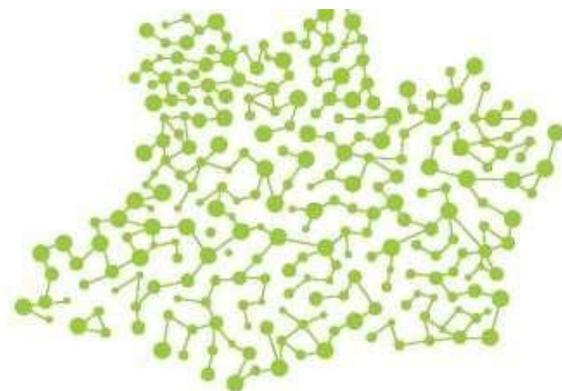
**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**FATORES ASSOCIADOS AO DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO
DA TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR EM UMA UNIDADE
REFERÊNCIA PARA HIV/AIDS**

**RENATA SPENER GOMES
CORDEIROS DOS SANTOS**

**MANAUS
2020**



**RENATA SPENER GOMES
CORDEIRO DOS SANTOS**

**FATORES ASSOCIADOS AO DIAGNÓSTICO
MICROBIOLÓGICO DA TUBERCULOSE
EXTRAPULMONAR EM UMA UNIDADE REFERÊNCIA
PARA HIV/AIDS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

Orientador: **Professor Doutor Allyson Guimarães da Costa**

Coorientadores: **Professor Doutor Marcelo Cordeiro dos Santos**

Professora Doutora Anete Trajman

MANAUS

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Spener-Gomes, Renata

Tuberculose Extrapulmonar: Fatores Associados à Confirmação do Diagnóstico Microbiológico / Renata Spener Gomes Cordeiro dos Santos. Manaus : [s.n], 2020. 79 f.: color.; 28 cm.

Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018.

Inclui bibliografia

Orientador: Guimarães, Allyson Cordeiro-Santos, Marcelo

Coorientador: Cordeiro-Santos, Marcelo; Trajman, Anete.

1. tuberculose. 2. tuberculose extrapulmonar. 3. diagnóstico. I. Guimarães, Allyson (Orient.).II. Cordeiro-Santos, Marcelo (Coorient.). III. Trajman, Anete (Coorient.). IV Universidade do Estado do Amazonas. IV. Tuberculose Extrapulmonar: Fatores Associados à Confirmação do Diagnóstico Microbiológico.

FOLHA DE JULGAMENTO

TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR: FATORES ASSOCIADOS À CONFIRMAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

RENATA SPENER GOMES CORDEIRO DOS SANTOS

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

À Deus por todas as bençãos
À Dom Bosco e Nossa Senhora Auxiliadora, por toda a proteção
Ao meu marido Marcelo, por todo amor e dedicação
À minha família amada: Beto, Regina, Roberta, Ramona, Chrystian, Marina e Felipe, por
sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a todos que tiveram qualquer contribuição para que esse estudo fosse executado com sucesso,

Ao meu marido e coorientador Dr. Marcelo Cordeiro, que desempenha diversos papéis na minha vida e que trabalha de forma incansável para manter o Grupo de Pesquisa em Micobacteriologia da FMT, minha admiração e meu amor;

À minha família, que entende minha ausência e que está sempre e incondicionalmente ao meu lado;

Aos colegas de trabalho que viraram amigos, Alexandra Brito, Allyson Guimarães, Jaquelane Silva e Elcimar Junior, por toda ajuda e por serem exemplos de competência para mim todos os dias;

A Dra. Anete Trajman, pela inestimável ajuda no manuscrito e com quem aprendi/aprendo demais, muito obrigada,

A todos que fizeram e fazem parte do Grupo de Pesquisa em Micobacteriologia da FMT, é um grande prazer trabalhar com cada um de vocês;

Ao grupo MONSTER, nas pessoas de María B. Arriaga e Bruno Andrade, realmente vocês são grandes;

À turma espetacular de mestrado/doutorado da PPGMT de 2018, pela amizade e toda ajuda durante o processo de mestrado;

À querida amiga Maria Eugênia, que embarcou nessa aventura do Mestrado e foi a responsável por altas risadas tornando tudo mais fácil, obrigada, amiga;

À toda equipe administrativa da PPGMT e queridos Docentes, em especial Iza, D. Conceição, Jordânia e Eduardo, muito obrigada pela paciência e auxílio;

Aos pacientes, para quem destinamos nosso produto, meu muito obrigada;

À toda a equipe de profissionais da saúde da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, que prestam a melhor assistência possível aos pacientes;

À UEA, FMT-HVD, CAPES e CNPq por terem possibilitado a realização dessa pesquisa, muito obrigada.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

O desenvolvimento desta pesquisa contou com auxílio de uma bolsa de estudos disponibilizada pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) durante os 24 meses de execução do projeto.

“Palavras são, na minha nada humilde opinião, nossa inesgotável fonte de magia, capazes de formar grandes sofrimentos e também de remediá-los.”

Dumbledore, J.K. Rowling

RESUMO

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa que pode acometer o pulmão e qualquer outro órgão, como linfonodo, pleura, cérebro e intestino. A confirmação microbiológica da tuberculose extrapulmonar (TBEP) é um desafio. Além de contemplar diversos aspectos clínicos, as amostras providas dos sítios anatômicos extrapulmonares são paucibacilares. Para obtenção dessa amostra é necessário procedimentos invasivos aumentando custo e atrasando o diagnóstico oportuno. Houve incremento do Xpert MTB/RIF Ultra na performance diagnóstica das amostras paucibacilares em comparação com a baciloscopia e a geração anterior, o Xpert MTB/RIF. Nesse contexto avaliamos prospectivamente com análise *post hoc* fatores associados a confirmação microbiológica de tuberculose. O estudo foi realizado na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, hospital de referência em doenças infecciosas em Manaus, Amazonas. De julho de 2018 a janeiro de 2019 foram incluídos 157 pacientes com tuberculose extrapulmonar presumida. O Xpert® MTB / RIF Ultra ou cultura foram considerados referência para confirmação microbiológica. As variáveis analisadas foram sexo, idade, status sorológico para HIV e coleta de amostra respiratória. Dos 157 pacientes com TBEP presumida, 60 (38%) coletaram apenas a amostra extrapulmonar com 05 resultados positivos (8%). 97 (62%) forneceram amostra extrapulmonar e respiratória com 27 resultados positivos (28%): 10 em ambas as amostras e 11 apenas nas respiratórias. Este último corresponde a 34% (11/32) de todos os resultados positivos. O exame de uma amostra respiratória triplicou a chance de confirmação microbiológica (odds ratio = 2,71; 1,04-7,81 ajustada para idade, sexo e status HIV). Concluímos que as amostras respiratórias devem ser examinadas em pacientes com TBEP presumida.

Palavras Chaves: tuberculose, extrapulmonar, diagnóstico, Xpert Ultra.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease that can affect the lung and any other organ, such as the lymph node, pleura, brain and intestine. Microbiological confirmation of extrapulmonary tuberculosis (TBEP) is a challenge. In addition to contemplating several clinical aspects, samples from extrapulmonary anatomical sites are paucibacillary. To obtain this sample, invasive procedures are necessary, increasing the cost and delaying the timely diagnosis. There was an increase in Xpert MTB / RIF Ultra in the diagnostic performance of paucibacillary samples compared to sputum smear microscopy and the previous generation, Xpert MTB / RIF. In this context, we prospectively assessed with post hoc analysis factors associated with microbiological confirmation of tuberculosis. The study was carried out at the Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, a referral hospital for infectious diseases in Manaus, Amazonas. From July 2018 to January 2019, 157 patients with presumed extrapulmonary tuberculosis were included. Xpert® MTB / RIF Ultra or culture were considered a reference for microbiological confirmation. The variables analyzed were sex, age, HIV serological status and respiratory sample collection. Of the 157 patients with presumed TBEP, 60 (38%) collected only the extrapulmonary sample with 05 positive results (8%). 97 (62%) provided an extrapulmonary and respiratory sample with 27 positive results (28%): 10 in both samples and 11 only in the respiratory ones. The latter corresponds to 34% (11/32) of all positive results. Examination of a respiratory sample tripled the chance of microbiological confirmation (odds ratio = 2.71; 1.04-7.81 adjusted for age, sex and HIV status). We conclude that respiratory samples should be examined in patients with presumed TBEP.

Keywords: tuberculosis, extrapulmonary, diagnosis, Xpert Ultra.

RESUMO LEIGO

A tuberculose é uma doença que afeta principalmente os pulmões, mas pode causar doença em outros órgãos como linfonodo, pleura, cérebro e intestino. A confirmação do diagnóstico da tuberculose extrapulmonar (TBEP), ou seja, a tuberculose fora do pulmão é difícil. Além de apresentar diferentes sinais e sintomas, as amostras coletadas fora do pulmão possuem poucos bacilos da tuberculose. Para coletar essas amostras são necessários procedimentos que invadem o organismo usando instrumentos cirúrgicos o que aumenta o custo e atrasa o diagnóstico da tuberculose. O Xpert MTB/RIF Ultra é um exame mais eficiente em descobrir tuberculose nas amostras extrapulmonares com poucos bacilos em comparação com a baciloscopia (o exame de BAAR) e a geração anterior, o Xpert MTB/RIF. Para melhorar o diagnóstico nessa situação, avaliamos quais os fatores ajudaram a alcançar o diagnóstico confirmado da tuberculose nos pacientes que investigaram tuberculose extrapulmonar. Durante julho de 2018 a janeiro de 2019 foram incluídos na pesquisa 157 pacientes investigando tuberculose extrapulmonar em um hospital de referência em TB/HIV. O Xpert® MTB/RIF Ultra ou cultura com resultado positivo foram considerados padrão para dizer se era realmente tuberculose. Dos 157 pacientes investigando tuberculose extrapulmonar, 60 (38%) coletaram somente amostra extrapulmonar com 11 resultados positivos (18%). 97 pacientes (62%) forneceram amostra extrapulmonar e respiratória com 22 resultados positivos (22%): 10 nas duas amostras e 11 somente na respiratória. Este último valor quer dizer que 34% de todos os resultados positivos foram encontrados na amostra respiratória. O exame de uma amostra respiratória aumentou em três vezes a chance de confirmar a tuberculose extrapulmonar. A nossa conclusão é que todo paciente que investiga tuberculose extrapulmonar deve também coletar amostra respiratória (coleta de escarro) para ajudar no diagnóstico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil habitantes), Unidade Federada, 2019.....	13
Figura 2. Porcentagem de casos de tuberculose extrapulmonar entre casos novos e recaídas, 2018.....	15
Figura 3. Resumo do incremento trazido pelo Xpert MTB/RIF, 2018.....	18
Figura 4. Cascata da transmissão da tuberculose, 2019.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características sociodemográficas dos participantes do estudo.....	30
Tabela 2. Descrição dos sítios anatômicos e resultados positivos em Xpert ® MTB/RIF Ultra e/ou cultura dos pacientes com e sem investigação pulmonar (amostra respiratória).....	31
Tabela 3. Forest plot of sensitivity and specificity of Xpert ® MTB/RIF and Xpert ® MTB/RIF Ultra respect to a culture (reference standard), in different groups.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BK	Bacilo de Koch
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (EUA)
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado
FVS	Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de Confiança
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MS	Ministério da Saúde
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PVHIV	Pessoas Vivendo com HIV
SR	Sintomático respiratório
TB	Tuberculose
PTB	Tuberculose pulmonar
EPTB	Tuberculose Extrapulmonar
UFC/ml	Unidade formadora de colônia por mililitro
SUS	Sistema Único de Saúde
SINAN	Sistema de Informações de Agravos de Notificação

SUMÁRIO

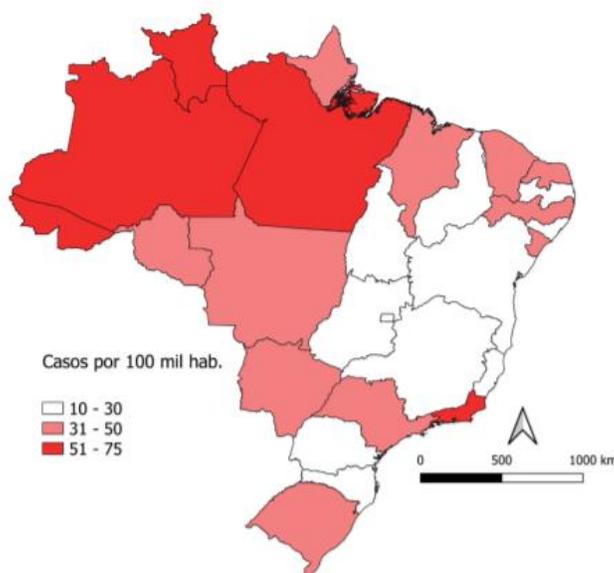
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Epidemiologia da tuberculose extrapulmonar.....	15
1.2. Testes diagnósticos para tuberculose.....	16
1.2.1. Baciloscopia	16
1.2.2. Cultura.....	17
1.2.3. Xpert® MTB/RIF e Xpert® MTB/RIF Ultra.....	17
1.3. Desafios no diagnóstico da tuberculose extrapulmonar.....	19
2. OBJETIVOS	21
2.1.1. Objetivo Geral.....	21
2.1.2. Objetivo Específico.....	21
3. MÉTODOS	21
4. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	23
4.1. Manuscrito científico redigido conforme normas da revista escolhida para submissão.....	23
4.2. Resultados adicionais.....	30
4.3. Discussão dos Resultados adicionais.....	32
5. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS	33
6. CONCLUSÃO	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
8. ANEXOS E APÊNDICES	39
8.1. Apêndice 1: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	39
8.2. Apêndice 2: Ficha de captura de dados clínicos (CRF).....	42
8.3. Apêndice 3: Documento de anuência do estudo.....	44
8.4. Apêndice 4: Procedimento Operacional Padrão (POP).....	45
8.4.1. POP 1. Recrutamento de participante de estudo	45
8.4.2. POP 2. Obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e do Termo de Assentimento.....	48
8.4.3. POP 3. Procedimentos para coleta de escarro do estudo.....	54
8.4.4. POP 4. Processamento de amostra pelo fluxo B.....	61
8.5. Apêndice 5: Status de submissão na revista International Journal of Infectious Disease.....	76

1. Introdução

Com 1,2 milhão de mortes no mundo em 2019, a tuberculose (TB) é a doença por causa infecciosa que mais mata atualmente (1). O número de mortes por TB ultrapassa àquelas causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) com 770 mil mortes (2) e malária com 405 mil mortes (3).

Em 2019, no Brasil, 73.864 casos novos de TB foram notificados sendo 72,2% com confirmação laboratorial. Em apenas em 30,4% desses casos houve realização da cultura (4). O Amazonas segue em primeiro entre os estados brasileiros com mais alto coeficiente de incidência, juntamente com o Rio de Janeiro, Acre, Roraima e Pará (Figura 1).

Figura 1. Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil habitantes), Unidade Federada, 2019.



Fonte: Ministério da Saúde, 2018

Em 2019, houve 3.281 casos novos de TB no Amazonas. Manaus contou com 61,8% desse número (2,029 casos notificados). De janeiro a agosto de 2020 foram, apenas, 297 casos. Essa diminuição na notificação em 2020 possivelmente reflete a pandemia da COVID-19 (5).

Apesar de ser uma doença milenar, é relativamente recente a criação de estratégias que organizassem as ações de combate à TB. O DOTS, criado em 1994 veio atender essa expectativa. Em 1997, a OMS publicou *“What is DOTS? A Guide to Understanding the*

WHO-recommended TB Control Strategy Known as DOTS”(6). O DOTS (Tratamento Diretamente Observado de Curta Duração) visava comprometimento governamental, a quebra do ciclo de transmissão e padronização dos dados que fornecessem suporte para avaliação de ações futuras. O DOTS foi seguido da estratégia *Stop TB* (7) lançada em 2006 cuja missão era um mundo livre da TB e tinha por objetivo reduzir drasticamente a carga global da doença até 2015 (8). O DOTS foi aprimorado para, juntamente com os objetivos de desenvolvimento do milênio relacionados à TB, melhorar desfechos como a diminuição da pobreza, diminuição da desnutrição e melhoria nos serviços de saúde dos países mais pobres. Posteriormente, em 2015, a estratégia *End TB*, foi difundida com ações organizadas para darem suporte a todos os programas Nacionais de TB ao redor do mundo, considerando suas particularidades. Traz metas arrojadas, como a redução em 75% das mortes por TB e 50% de redução nas taxas de incidência até 2025.

No Brasil, o Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Saúde Pública (9) lançado em 2017 pelo Ministério da Saúde (MS) tem como base a estratégia *End TB* e conta com três pilares que direcionam as ações de combate à doença. O primeiro consiste na prevenção, cuidado integrado e centrado no paciente. O diagnóstico oportuno, investigação dos contatos e acesso ao tratamento integram esse pilar. O segundo envolve o empenho em políticas públicas voltadas para o cuidado e a prevenção da TB juntamente com o engajamento comunitário. O terceiro pilar apoia a intensificação da pesquisa e inovação com o desenvolvimento de novas ferramentas, sejam elas direcionadas aos processos de tratamento, diagnóstico ou intervenções (10).

Através das publicações perceberemos o avanço das pesquisas em TB nas últimas décadas. A pesquisa, como parte do terceiro pilar, traz novidades ao enfrentamento dessa doença, porém, ainda existe lacuna de conhecimento no que diz respeito à investigação de pacientes com formas extrapulmonares de tuberculose, acurácia dos novos testes diagnósticos nas mais variadas formas de EPTB, manejo de corticoide, regimes para TB MDR, por exemplo (11).

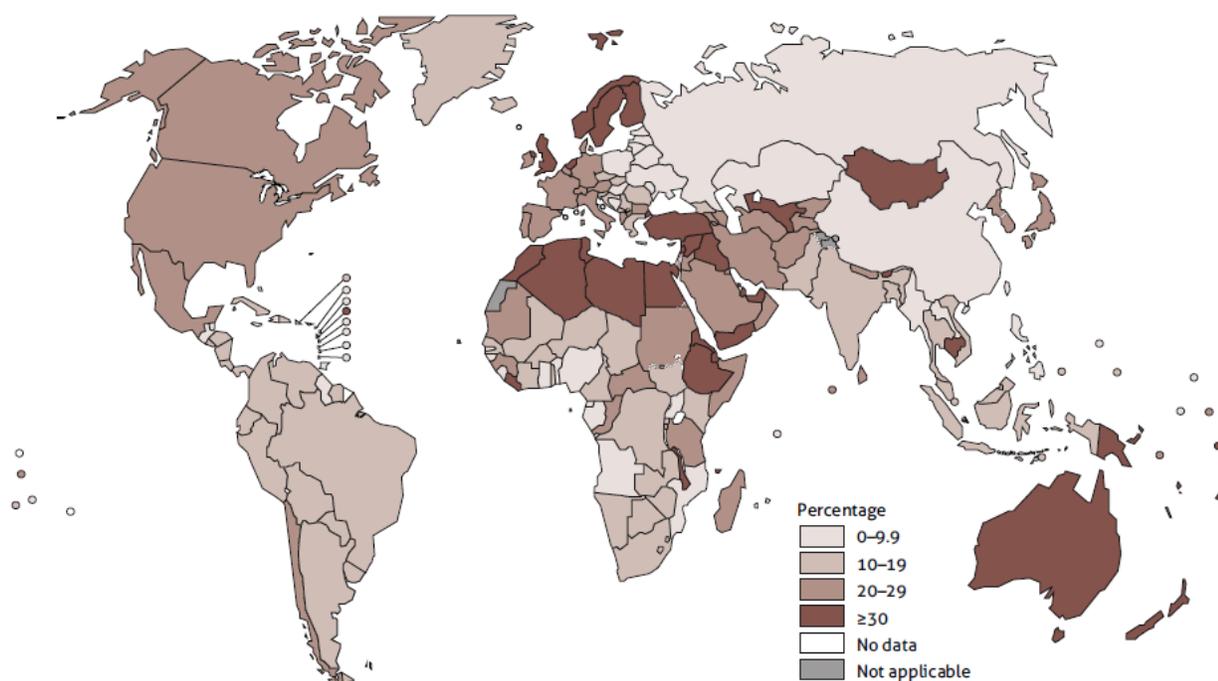
Esta pesquisa visa compreender fatores associados ao diagnóstico microbiológico da EPTB em uma unidade de referência para doenças infecciosas.

1.1 Epidemiologia da tuberculose extrapulmonar

As formas extrapulmonares de TB compõem, globalmente, 15% de todos os casos novos e recaídas, conforme figura abaixo (12).

Figura 2. Porcentagem de casos de tuberculose extrapulmonar entre casos novos e recaídas, 2018.

Percentage of extrapulmonary cases among new and relapse TB cases, 2018



Fonte: WHO, Global Tuberculosis Report, 2019.

Em relação à epidemiologia das formas extrapulmonares, no continente africano a forma ganglionar é a mais comum, com predominância no sexo feminino, 53% (95%CI: 51–55%) (13). Na China, um estudo em pacientes internados apontou que a tuberculose pleural é a forma mais comum com 50,1% dos casos e acomete o sexo masculino em sua maioria, 60,17% (14). Nos Estados Unidos da América, a incidência de EPTB foi de 18% nos anos de 1993 a 2006, com a forma mais comum a ganglionar (40,4%), seguida da pleural (19,8%) (15).

No Brasil, as formas extrapulmonar mais comuns são as pleural (42%) e ganglionar (21%) em pesquisa realizada com dados do SINAN (16). Um estudo realizado no estado do Espírito Santos utilizando banco de dados em tuberculose e HIV apontou como forma extrapulmonar mais comum a ganglionar (17).

1.2 Testes diagnósticos para tuberculose

Em março de 1882, Robert Koch anunciava em Berlim a descoberta do agente causador da tuberculose, o bacilo de Koch (18). Por mais de 100 anos, a baciloscopia e a cultura foram utilizadas para diagnóstico da tuberculose, porém, com a crescente demanda trazida pela tuberculose resistente às medicações, novas formas de diagnóstico foram sendo desenvolvidas.

1.2.1 Baciloscopia

Utilizado para diagnóstico em locais sem os testes de amplificação de ácido nucleico (como por exemplo o Xpert MTB/RIF Ultra) e indicado para controle de tratamento, a baciloscopia ou pesquisa de Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR) consiste em um esfregaço da amostra de um sítio anatômico corada através de um método padronizado (19). No Brasil a técnica utilizada é a de Ziehl Neelsen estabelecida pelo PNCT. É uma técnica de baixo custo com média de R\$ 14,16 e a liberação do resultado ocorre em até 24h (20).

A baciloscopia possui sensibilidade variada que deve levar em conta o paciente e o tipo de amostra. Para àquelas pulmonares de paciente não HIV a sensibilidade pode chegar à 90% considerando duas amostras coletadas. Para amostras conhecidamente paucibacilares como naquelas produzidas pelas crianças, PVHIV e nos sítios extrapulmonares costuma ser baixa. Em meta-análise de 2018, destacamos a sensibilidade da baciloscopia em amostra de líquido pleural que variou de 0 a 10% e em líquido de 2 a 30% (21). Para que o resultado seja positivo, são necessários 5,000 a 10,000 bacilos por mililitro (mL) (22).

No Manual de Recomendação para Controle da Tuberculose no Brasil, a baciloscopia faz parte do fluxo diagnóstico na impossibilidade de realizar o teste rápido molecular e é realizada mensalmente nos pacientes com tuberculose pulmonar para controle bacteriológico (23).

1.2.2 Cultura

Método que viabiliza o crescimento e, posteriormente, a identificação do bacilo álcool-ácido resistente em meio ao material específico para micobactérias. É utilizado, juntamente com o teste rápido molecular e a baciloscopia para definir caso confirmado laboratorialmente no Brasil (9). A cultura pode ser do tipo líquida e sólida. A última possui a vantagem de ter preço inferior à líquida e índice de contaminação menor. Os meios sólidos mais utilizados Löwenstein-Jensen (LJ) e Ogawa-Kudoh (OK) gerando resultado em até 8 semanas. A cultura líquida é realizada através de meio automatizado e apresenta um custo superior quando comparando à sólida. Apresenta um índice superior em contaminação, entretanto, traz como vantagem o tempo para liberação do resultado que não ultrapassa 6 semanas (24).

1.2.3 Xpert MTB/RIF (Xpert) and Xpert MTB/RIF Ultra (Ultra)

Através das publicações percebemos o avanço das pesquisas nas últimas décadas na área de diagnóstico em tuberculose. Uma delas foi a criação do Xpert® MTB/RIF (Xpert; Cepheid, Sunnyvale, California, US) um teste de amplificação de ácido nucleico que identifica o DNA do bacilo com resultado disponível em cerca de duas horas. Até então só se dispunha da baciloscopia com tempo de resultado em 24 horas e cultura com no mínimo 06 semanas para diagnóstico do *M.tb*. No Brasil, o Xpert foi implementado em 2014 com aumento na detecção de novos casos (25,26). Em comparação com a baciloscopia, o incremento na detecção de casos foi de 23% entre casos com cultura positiva. A figura abaixo mostra o incremento em geral trazido pelo Xpert.

Figura 3. Resumo do incremento trazido pelo Xpert MTB/RIF, 2018.

Review question: What is the diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF assay for detection of pulmonary TB? Patients/population: Adults with presumed pulmonary TB Role: Xpert MTB/RIF assay used as an initial test replacing microscopy and used as an add-on test following a negative smear microscopy result Index test: Xpert MTB/RIF assay Reference standards: Solid or liquid culture Studies: Cross-sectional Setting: Mainly intermediate level laboratories						
Type of analysis	Effect (95% credible interval)	No. of participants (studies)	Test result	Number of results per 1000 patients tested (95% CrI) ¹		
				Prevalence 2.5%	Prevalence 5%	Prevalence 10%
TB detection, Xpert MTB/RIF used as an initial test replacing smear microscopy	Median pooled sensitivity 89% (85, 92) and median pooled specificity 99% (98, 99)	8998 (22)	True Positives	22 (21, 23)	45 (43, 46)	89 (85, 92)
			False Negatives	3 (2, 4)	6 (4, 8)	11 (8, 15)
			False Positives	10 (10, 20)	10 (10, 19)	9 (9, 18)
			True Negatives	965 (956, 965)	941 (931, 941)	891 (882, 891)
Smear-positive, culture-positive	Median pooled sensitivity 98% (97, 99); specificity of Xpert MTB/RIF could not be estimated in these studies	1936 (21)	True Positives	25 (24, 25)	49 (49, 50)	98 (97, 98)
			False Negatives	1 (0, 1)	1 (1, 2)	2 (1, 3)
			False Positives	***	***	***
			True Negatives	***	***	***
Smear-negative, culture-positive	Median pooled sensitivity 67% (60, 74) and median pooled specificity 99% (98, 99)	7565 (21)	True Positives	17 (15, 19)	34 (31, 37)	68 (61, 74)
			False Negatives	8 (7, 10)	16 (13, 20)	32 (26, 39)
			False Positives	10 (10, 20)	10 (10, 19)	9 (9, 18)
			True Negatives	965 (956, 965)	941 (931, 941)	891 (882, 891)
HIV-positive	Median pooled sensitivity 79% (70, 86) and median pooled specificity 98% (96, 99)	1789 (7)	True Positives	20 (18, 22)	40 (35, 43)	79 (70, 86)
			False Negatives	5 (4, 8)	11 (7, 15)	21 (14, 30)
			False Positives	20 (10, 39)	19 (10, 38)	18 (9, 36)
			True Negatives	956 (936, 965)	931 (912, 941)	882 (864, 891)

Fonte: Kohli *et al*, 2018

Como visto na figura acima, para o grupo de amostras baciloscopia negativas com cultura positivas, a sensibilidade foi de 67% sendo pouco satisfatória (27). Para suplantar essa deficiência uma nova geração desse ensaio, o Xpert® MTB/RIF Ultra (Ultra), foi lançado pela Cepheid em 2017 e endossado pela OMS no mesmo ano. O Ultra é utilizado em todo território brasileiro desde novembro de 2019 e mostra desempenho melhor que o antecessor para as amostras paucibacilares. Em meta-análise comparando os dois exames em amostras extrapulmonares, a sensibilidade e especificidade para o Ultra foram de 85.6% (95% IC 76.7–91.5%) e 94.7% (95% IC 87.0–97.9%) quando que no Xpert consistiu em 64.1% (95% IC 50.0–76.1%) e 98.5% (95% IC 95.6–99.5%) (28).

Para as amostras pulmonares em geral, a sensibilidade do Ultra foi 89.2% (95% IC 82.1–93.7%) em comparação ao Xpert 77.6% (95% IC 65.0–85.2%). No que diz respeito à especificidade, enquanto o Ultra apontou 96.7% (95% IC 95.1–97.8%), o Xpert trouxe um valor de 99.1% (95% IC 97.7–99.7%) (29).

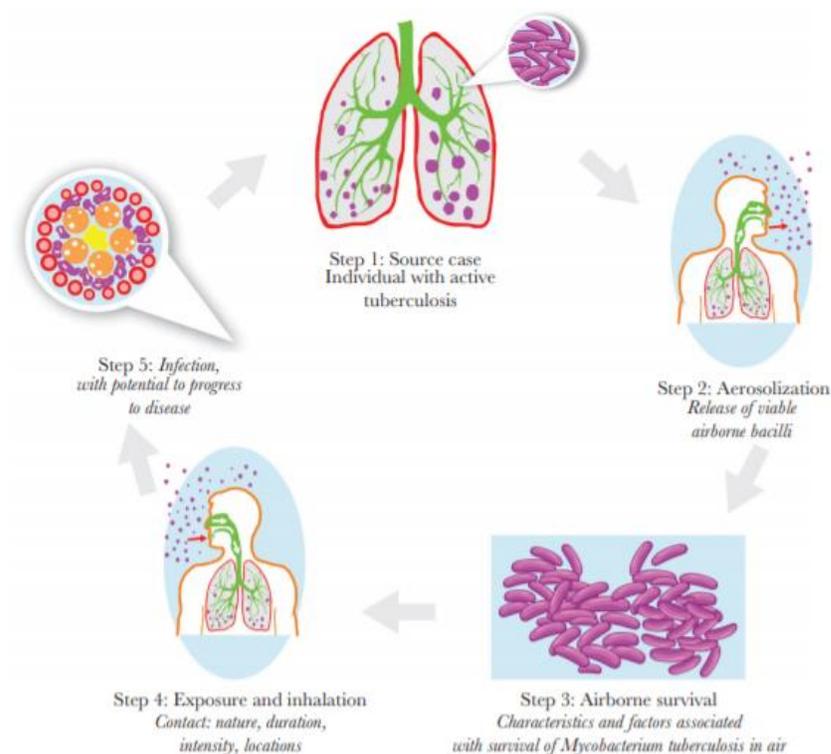
Outras vantagens do Ultra podem ser ressaltadas. O limite de detecção do Xpert que era de 112,6 UFC/ml passando para 15,6 UFC/ml no Ultra melhora a detecção da tuberculose principalmente nas amostras paucibacilares acima pontudas. Ademais, houve

a adição de dois novos genes (*rpoB* e IS6110); e um tubo de maior capacidade contendo o dobro de amostra clínica, o que possibilita aumento nessa detecção. Das categorias de detecção do exame anteriormente designadas para o Xpert em *high*, *medium*, *low* e *very low*, houve a adição da categoria *trace*. No Brasil, essa categoria deve ser interpretada segundo o ofício circular número 7 publicado pelo MS que orienta o uso do Ultra. Para PVHIV, crianças abaixo de 10 anos e TBEP presumida, *trace* é diagnóstico confirmatório para TB. Na população em geral, profissionais de saúde, nas populações privadas de liberdade e em situação de rua, indígenas e contatos de TB drogarresistente o resultado deve ser interpretado como inconclusivo e deve-se seguir na investigação (30,31).

1.3 Desafios no diagnóstico da tuberculose extrapulmonar

Tendo como agente etiológico o complexo *Mycobacterium tuberculosis* que engloba *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae*, a tuberculose é doença infecciosa com transmissão aérea e que pode comprometer outros órgãos do corpo humano além do pulmão. A infecção se estabelece quando uma pessoa saudável tem contato com aerossóis de uma pessoa infectada com o bacilo de Koch. Essa partícula é inalada alcançando os alvéolos pulmonares sendo fagocitada pelos macrófagos alveolares. Caso não haja sucesso em eliminar o bacilo, esse pode migrar para o tecido pulmonar intersticial. Células dendríticas e monócitos, por sua vez, transportam o bacilo até o linfonodo pulmonar apresentando-o às células T. A partir daí, tem-se a mobilização para formação do granuloma, caracterizando, nessa etapa, a infecção latente pelo *M. tuberculosis*. O paciente acometido encontra-se assintomático (32). Caso a replicação do bacilo seja intensa e o granuloma falhe na contenção, a tuberculose ativa está instalada. Nessa etapa o paciente encontra-se sintomático (tosse, perda ponderal, sudorese noturna). Além do pulmão, outros órgãos podem ser acometidos outros gânglios linfáticos, pleura e sistema nervoso central (22). A figura abaixo ilustra a cascata de transmissão da TB.

Figura 4. Cascata da transmissão da tuberculose, 2019.



Fonte: Churchyard et al, 2017

A transmissão aérea é bem estabelecida a partir das formas pulmonares e laríngicas. Já em pacientes com tuberculose extrapulmonar presumida, a transmissão pode se estabelecer por outros meios. A manipulação de feridas infectadas merece atenção em relação às medidas de controle de infecção hospitalar em TB. No manejo de feridas potencialmente infectadas, a drenagem ou limpeza pode gerar aerossóis contribuindo para surtos hospitalares (33–35). Outra forma de transmissão ocorre após uso de broncoscópio, contaminado, quando a limpeza e desinfecção não foram adequadas (36,37).

A tuberculose extrapulmonar presumida pode se apresentar em concomitância com forma pulmonar. Na tuberculose de coluna vertebral a concomitância pode abranger de 2 a 80% e nem sempre é investigada (38). Na tuberculose pleural, igualmente. Um fluxograma de investigação proposto por *Shaw et al* traz como etapa inicial a toracocentese conjuntamente com a coleta de escarro induzido e, quando na impossibilidade de realizar a toracocentese, considerar o escarro com resultado positivo o diagnóstico confirmado de tuberculose pulmonar e pleural (39).

O diagnóstico da TB nas formas extrapulmonares é um desafio. Em uma coorte de 2,695 pacientes (África, América e Caribe) com tuberculose extrapulmonar presumida, apenas 57,3% dos pacientes fizeram algum exame confirmatório (baciloscopia, cultura ou Xpert) e aqueles com TBP foi de 80,7%. Em apenas 6,0% das amostras foi utilizado Xpert e onde houve a maior positividade (65,7%). Um dado relevante que o artigo traz é que os pacientes com confirmação microbiológica seja de EPTB, seja de PTB apresentaram mortalidade inferior àqueles com resultados negativos. Isso aponta para a necessidade de se buscar ferramentas que auxiliem nessa confirmação (40).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Analisar os fatores associados com a confirmação microbiológica em pacientes com tuberculose extrapulmonar presumida atendidos em um hospital de referência para doenças infecciosas.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar a acurácia do Xpert MTB/RIF Ultra em amostras extrapulmonares.

3. MÉTODOS

Esta é uma análise *post hoc* de um estudo de coorte observacional prospectivo realizado na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), centro acadêmico de referência em coinfeção TB / HIV e outras doenças infecciosas, localizado na região amazônica brasileira. Entre julho de 2018 e janeiro de 2019, 157 pacientes ambulatoriais e internados com idade ≥ 18 anos com EPTB presumível foram testados para TB no laboratório de micobacteriologia da FMT-HDV e incluídos na coorte.

Os dados clínicos e demográficos (idade, sexo, estado de HIV, contagem de CD4 e carga viral) foram coletados através do formulário de coleta de dados (apêndice 2) e do prontuário eletrônicos dos pacientes. A decisão de qual espécime deveria ser obtida foi tomada pela equipe clínica, sem a intervenção dos pesquisadores. Consideramos investigação respiratória para tuberculose a amostra respiratória coletada e processada

(escarro, escarro induzido, lavado broncoalveolar e lavado gástrico). Os dados radiográficos foram coletados dos pacientes com resultado positivo (Ultra ou cultura) nas amostras extrapulmonares e respiratórias através do programa IMPAX.

As amostras foram processadas de acordo com a rotina. Todas as amostras clínicas foram submetidas a cultura e testes moleculares. A cultura é conduzida na FMT-HVD usando o sistema BD BACTEC™ MGIT™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) ou através da cultura sólida meio Ogawa-Kudow. Consideramos diagnóstico microbiológico confirmado o resultado positivo no teste molecular ou na cultura. O laboratório de micobacteriologia tem recebido 100% de proficiência no teste de proficiência INSTAND nos últimos quatro anos.

O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) por escrito foi obtido de cada participante do estudo. Todas as investigações clínicas foram conduzidas de acordo com os princípios expressos na Declaração de Helsinque. Todos os dados analisados pela equipe de pesquisa foram desidentificados. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da FMT-HVD (# 2.525.182).

Para os dados expressos em proporções e mediana a apresentação foi em intervalos interquartílicos (IQR). Além disso, foi realizado um modelo de regressão multivariada para avaliar odds ratios (OR) e seus intervalos de confiança de 95% (ICs) da associação de uma amostra respiratória positiva com diagnóstico confirmado ajustado para idade (anos), sexo e status sorológicos.

A análise de acurácia foi realizada utilizando o programa SPSS e a apresentação do dado feita através do gráfico em floresta. A cultura foi considerada referência para esse cálculo. Do total da amostra de 157 exames Ultra realizados, 21 culturas tiveram resultado contaminado e 1 não realizada.

4. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

Artigo submetido ao *International Journal of Infectious Disease(IJID)* sob forma de *Short Communication* no dia 18/11/2020 com o status “Under review”, conforme apêndice 5.

4.1. Manuscrito científico redigido conforme normas da revista escolhida para submissão

Examination of respiratory specimens improves microbiological diagnosis of patients with presumptive extrapulmonary tuberculosis

Renata Spener-Gomes^{a,b,c}, Allyson Guimarães Costa^{a,b,d}, Hilda Ferreira de Melo^a, Alexandra Brito de Souza^{a,b} Francisco Beraldi-Magalhães^{a,b,e,f}, Jaqueline Silva Jesus^b, María B. Arriaga^{g,h,i}, Afrânio Kritskij, Izabella Safe^b, Bruno B. Andrade^{g,h,i}, Anete Trajman^{b,j,l}, Marcelo Cordeiro-Santos^{a,b,m}*

a Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil.

b Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil.

c Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil.

d Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Brazil.

e Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, Curitiba, Brazil.

f Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, Brazil.

g Laboratório de Inflamação e Biomarcadores, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil.

h Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil.

i Multinational Organization Network Sponsoring Translational and Epidemiological Research (MONSTER) Initiative, Salvador, Brazil.

j Instituto de Medicina Social, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

I McGill International TB Centre, McGill University, Montreal, Canada.

m Universidade Nilton Lins, Manaus, Brazil.

***Corresponding author: Marcelo Cordeiro-Santos**

Av. Pedro Teixeira, 25, Manaus, Amazonas, 69040-000, phone +55 92 99119-9199.

E-mail: marcelocordeiro@uea.edu.br

Keywords: tuberculosis, extrapulmonary, diagnosis, Xpert Ultra

ABSTRACT

Objectives

Microbiological confirmation of extrapulmonary tuberculosis (EPTB) is challenging for several reasons. Paucibacillary nature of the sample; scarce resources, mainly in middle and low-income countries; the need for hospitalization and, unfavorable outcomes. We evaluated prospectively the diagnostic role of respiratory specimen examination in a cohort of patients with presumptive EPTB.

Methods

From July 2018 to January 2019 in a TB/HIV reference hospital, a cohort of 157 patients with presumed EPTB was evaluated. Xpert® MTB/RIF Ultra or culture was considered for microbiologic confirmation.

Results

Out of 157 patients with presumptive EPTB, 97 (62%) provided extrapulmonary and respiratory specimens, whereas 60 (38%) collected extrapulmonary specimens only. Of the 60 patients with extrapulmonary samples, 5 (8%) were positive. Of those with respiratory and extrapulmonary samples examined, 27 (28%) were positive: 10 in both

respiratory and extrapulmonary samples, 6 in the extrapulmonary sample and 11 only in the respiratory sample. Having a respiratory specimen examined tripled the chance of microbiological confirmation (odds ratio= 2.71; 1.04-7.81).

Conclusion

We conclude that respiratory samples should be examined in patients with presumptive EPTB.

INTRODUCTION

Of the 7 million new tuberculosis (TB) cases reported worldwide in 2018, 15% were EPTB (WHO, 2019). EPTB is usually paucibacillary and presentation may be atypical, thus, more challenging to diagnose. Invasive procedures may be required, resulting in delayed diagnosis, need for hospitalization, unfavorable outcomes, and high costs (Norbis et al., 2014)

Extrapulmonary presentations such as ganglionic and pleural TB are known to occur with concomitant pulmonary TB (9). However, most current TB guidelines do not include respiratory specimen examination in the evaluation of presumptive EPTB. The new Xpert® MTB/RIF Ultra increased the yield of paucibacillary sample examination compared to smear microscopy or to the previous generation of the molecular test (Zhang et al., 2020). We evaluated whether the examination of respiratory samples for microbiologic confirmation of TB could improve the diagnosis of patients with presumptive EPTB.

METHODS

This is a *post hoc* analysis of a prospective observational cohort study conducted at *Fundação de Medicina Tropical* Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), an academic reference center for TB/HIV co-infection, located in the Brazilian Amazonian region.

Between July 2018 and January 2019, 157 out- and inpatients aged ≥ 18 years with presumptive EPTB were tested for TB in FMT-HVD's mycobacteriology laboratory and included in the cohort. The laboratory has been receiving 100% proficiency on INSTAND test for the past four years. The decision of which specimen should be obtained was made by the clinical team, without the researchers' intervention.

Clinical and demographic data (age, sex, HIV status, CD4 count, and viral load) were gathered from patients' electronic medical records. Data on respiratory symptoms (dyspnea, chest pain, or cough) was collected from all patients with confirmed TB in any anatomic site.

In FMT-HVD, all samples from patients with presumptive TB are submitted to liquid culture and molecular test (Xpert® MTB/RIF Ultra, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA). We considered confirmed microbiologic diagnosis if any specimen had a positive result for a molecular test or culture.

Written informed consent was obtained from participants. Clinical investigations were conducted by the Declaration of Helsinki. All the information handled by the research team was de-identified.

Descriptive data are expressed as proportions and their 95% confidence intervals (CI) or median and their interquartile ranges (IQR). A multivariate regression model evaluated the association of having a respiratory sample examined with the diagnosis confirmation using the odds ratios (OR) and their 95% CI adjusted for age (in years), sex and HIV status.

RESULTS

Among 157 patients with presumptive EPTB, the median (IQR) age was 37 (30 - 43) years, 60% were male, and 75% were people living with HIV. From these, 62% had a CD4⁺ T-cell count below 200 cells/mm³ and 64% had a detectable viral load. Extrapulmonary

specimens examined were cerebrospinal fluid (n=56), urine (n=37), skin (n=29), lymph node (n=21), pleural fluid (n=12), and ascitic fluid (n=2).

Sixty patients (38%) provided only extrapulmonary specimens of which 5 (8%) were positive whereas 97 (62%) provided extrapulmonary and respiratory specimens, of which 27 (28%) were positive; 10 in both respiratory and extrapulmonary specimens, 6 only in the extrapulmonary specimen and 11 only in the respiratory specimen. These latter corresponded to 34% of all positive results and represented an 11% overall added value. Out of 21 patients with a positive respiratory sample, 4 (19%) patients had no respiratory symptoms. Adjusted for age, sex, and HIV status (Figure 1), having a respiratory specimen examined was associated with microbiological confirmation of EPTB (OR= 2.71; 1.04-7.81).

DISCUSSION

In this cohort of patients with presumptive EPTB, the chance to microbiologically confirm the diagnosis of tuberculosis almost tripled when a respiratory sample was obtained. In poor-resource settings, adding a respiratory sample examination to the EPTB work up may not only increase the chances of rapidly confirming TB and initiating therapy but also be more cost-effective than hospitalization for invasive procedures - although this analysis was beyond the scope of the current study.

In addition, our findings corroborate previous concerns about EPTB patients' contagiousness, and implies in the need for contact surveillance and infection control actions, usually neglected in EPTB. (9)

Our study has limitations. Firstly, despite being a prospective study, the analysis was performed *post hoc*. Patients were managed by the clinical team as per their decision as there are no clear guidelines for respiratory sample collection in the management of

patients with presumptive EPTB in Brazil (9) It is likely that patients with respiratory symptoms had more respiratory sample examination than those without respiratory symptoms, leading to bias selection. Thus, robust conclusions on the yield of respiratory specimen examination in all EPTB patients are not possible. Regardless of these limitations, we believe that systematically screening of patients with presumptive EPTB using respiratory specimens should be considered in clinical settings while awaiting further studies results.

Funding

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance code 001. The study sponsor was not involved in any phase of the manuscript conception, write, and submission.

Ethical approval statement

The study was approved by the Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado Ethics Committee (#2.525.182).

Conflict of interest statement

None of the authors have any conflict of interest (financial or personal) in this study.

Acknowledgments

The authors acknowledge the support of the Clinical, Administrative Staff, the Mycobacteriology Laboratory of FMT-HVD and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES).

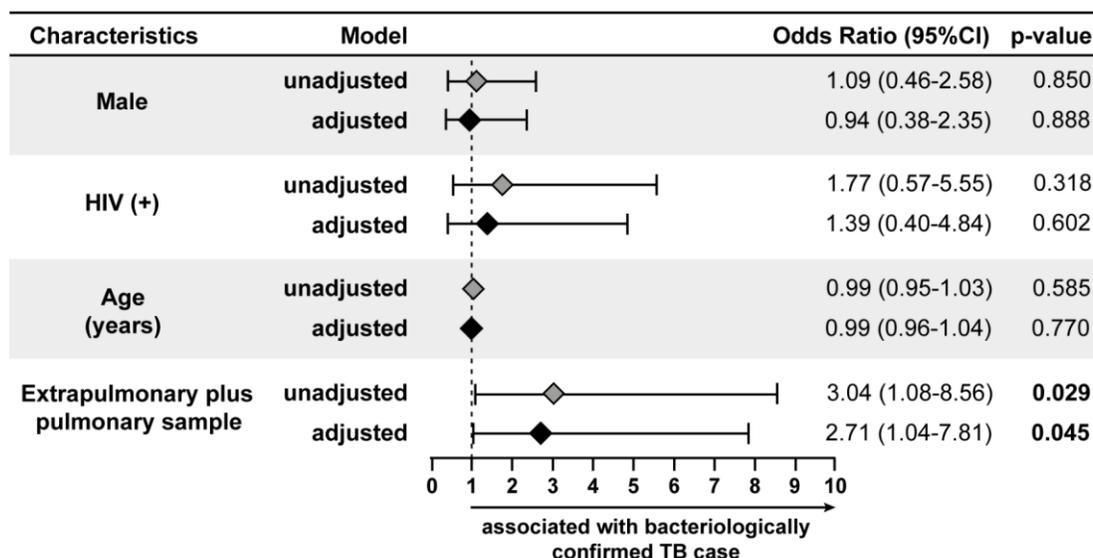
References

Hernández-Garduño E, Cook V, Kunimoto D, Elwood RK, Black WA, FitzGerald JM.

- Transmission of tuberculosis from smear negative patients: A molecular epidemiology study. *Thorax* 2004;59:286–90. <https://doi.org/10.1136/thx.2003.011759>.
- Norbis L, Alagna R, Tortoli E, Codecasa LR, Migliori GB, Cirillo DM. Challenges and perspectives in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12:633–47. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.899900>.
- Saúde, Ministério da. MANUAL DE RECOMENDAÇÕES PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE NO BRASIL. 2018. (Accessed 10 October 2020). <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2019/manual-de-recomendacoes-para-o-controle-da-tuberculose-no-brasil>
- Schirmer P, Renault CA, Holodniy M. Is spinal tuberculosis contagious? *Int J Infect Dis* 2010;14. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.11.009>.
- Shaw JA, Diacon AH, Koegelenberg CFN. Tuberculous pleural effusion. *Respirology* 2019;24:962–71. <https://doi.org/10.1111/resp.13673>.
- Züker K, Ballif M, Kiertiburanakul S, Chenal H, Yotebieng M, Grinsztejn B, et al. Diagnosis and clinical outcomes of extrapulmonary tuberculosis in antiretroviral therapy programmes in low- and middle-income countries: a multicohort study. *J INT AIDS SOC* 2019. <https://doi.org/10.1002/jia2.25392/full>.
- Zhang M, Xue M, He J qing. Diagnostic accuracy of the new Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculosis disease: A preliminary systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2020; 90:35–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.09.016>.
- WHO. Global tuberculosis report. 2019. (Accessed 10 October 2020). https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

Figure legend

Figure 1: Factors analyzed for the association with bacteriological confirmation of extrapulmonary tuberculosis.



4.2 Resultados Adicionais

As características sociodemográficas constam na tabela 1. A maioria dos pacientes arrolados foram do sexo masculino (60%) com média de idade de 37 anos (30- 43). 75% eram PVHIV e destes 62% com contagem de células TCD4 + abaixo de 200 e 64% com carga viral detectável. Os sítios anatômicos foram LCR (n=56), urina (n=37), pele (n=29), linfonodo (n=21), líquido pleural (n=12) e líquido ascítico (n=2).

Tabela 1. Características sociodemográficas dos participantes do estudo

Características	Total (n=157)
Homens , n (%)	94 (60)
Idade , mediana (IQR*)	37 (30-43)
PVHIV , n (%)	118 (75)
CD4/mm³ < de 200 , n (%)	74 (62)
Carga viral detectável , n (%)	76 (64)

*Intervalo interquartil

60 pacientes coletaram unicamente amostra extrapulmonar. Desses, houve 05 resultados Ultra positivos (8%). Em 97 pacientes houve coleta de amostra respiratória concomitante, com 27 resultados Ultra positivos (28%). Os sítios anatômicos extrapulmonares onde houve maior proporção de coleta respiratória ocorreu em linfonodo (76%) e urina (75%), como descrito na tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos sítios anatômicos e resultados positivos em Xpert® MTB/RIF Ultra e/ou cultura dos pacientes com e sem investigação pulmonar (amostra respiratória)

Tipo da amostra extrapulmonar	N	Sem amostra respiratória N: 60		Com amostra respiratória N: 97			
		N (%)	EPTB + (%)	N (%)	EPTB + PTB + (%)	EPTB + PTB - (%)	EPTB - PTB+ (%)
LCR*	56	20 (35)	0	36 (65)	1 (3)	1 (3)	5 (14)
Urina	37	9 (25)	0	28 (75)	2 (7)	6 (21)	6 (21)
Pele	29	19 (66)	0	10 (34)	0	0	0
Gânglio	21	5 (24)	3 (60)	16 (76)	5 (31)	4 (25)	0
Líquido pleural	12	6 (50)	2 (33)	6 (50)	2 (33)	1 (16)	0
Líquido ascítico	2	1 (50)	0	1 (50)	0	0	0
Total	157	60 (38)	5 (8)	97 (62)	10 (10)	6 (6)	11 (11)

EPTB +: amostra extrapulmonar com resultado do Xpert® MTB/RIF Ultra positivo e/ou cultura positiva

PTB +: amostra respiratória com resultado do Xpert® MTB/RIF Ultra positivo e/ou cultura positiva

*LCR: Líquido cefalorraquidiano

A tabela 3 traz os dados da acurácia do Ultra nas amostras extrapulmonares.

Group	N	AUC (95%IC)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	TP	TN	FP	FN
All								
Xpert MTB/RIF	117	94 (88-97)	91.7 (61.5 - 99.8)	96.2 (90.5 - 99.0)	11	101	4	1
Xpert MTB/RIF Ultra	135	97 (93-99)	100 (73.5 - 100)	94.3 (88.6 - 97.7)	3	3	3	3
HIV (+)								
Xpert MTB/RIF	90	93 (86-97)	90 (55.5 - 99.7)	96.2 (89.4 - 99.2)	9	77	3	1
Xpert MTB/RIF Ultra	102	98 (91-99)	100 (69.2 - 100)	93.5 (86.3 - 97.6)	10	86	6	0
Smear (-)								
Xpert MTB/RIF	107	91 (84-95)	83.3 (35.9 - 99.6)	98 (93.0 - 99.8)	5	99	2	1
Xpert MTB/RIF Ultra	124	98 (93-99)	100 (54.1 - 100)	95.8 (90.4 - 98.6)	6	113	5	0

Figure 3. Forest plots of sensitivity and specificity of Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra respect to a culture (reference standard), in different groups. The squares represent the sensitivity and specificity and the black line is a confidence interval (CI). AUC : Area under curve. TP: True positive, TN: True negative, FP: False positive, FN: False negative.

A sensibilidade apontada pelo Ultra foi de 100% (73,5-100%) quando consideramos todas as amostras, comparando com 91,7% (61,5-99,8) do Xpert. A especificidade do Xpert de 96,2% (90,5-99,0%) foi ligeiramente superior à do Ultra com 94,3% (88,6-97,7%).

Nas amostras consideradas paucibacilares (status HIV positivo e baciloscopia negativa) a sensibilidade do Ultra mostrou-se superior ao Xpert com, respectivamente, 100% (54,1-100%) e 83,3% (35,9-99,6).

4.3 Discussão dos Resultados Adicionais

Nesta coorte prospectiva de pacientes com tuberculose extrapulmonar presumida, a chance de confirmar microbiologicamente o diagnóstico de tuberculose quase triplicou quando uma amostra respiratória foi obtida.

O primeiro ponto da discussão enfatiza o fluxo de investigação do paciente com formas extrapulmonares. O Manual de Recomendações para o Controle da tuberculose no Brasil define SR como paciente que apresenta tosse por três semana ou mais e que deve ser avaliado para tuberculose através de exames bacteriológicos (43,44). Em pacientes com quadro clínico típico de tuberculose apresentando tosse, perda ponderal, sudorese noturna, o fluxo de investigação é claro e preciso, incluindo orientações sobre quais exames solicitar. Na investigação de pacientes com formas extrapulmonares as orientações são limitadas e não há menção sobre investigação pulmonar em pacientes com tuberculose extrapulmonar presumida.

Ao contrário do que ocorre no manual brasileiro, o guideline do CDC (29) em orientações para o diagnóstico da tuberculose em ambientes hospitalares é categórico em afirmar que todo paciente com tuberculose forma extrapulmonar presumida deve ser avaliado com amostra respiratória coletada concomitante, seja criança ou adulto. Aponta que pacientes com tuberculose pleural costumam cursar com tuberculose pulmonar com frequência e que todo paciente com tuberculose forma extrapulmonar deve ser considerado, também, como portador de forma pulmonar presumida até que exames comprovem o contrário. Essa etapa de investigação pulmonar auxilia na definição de se optar por isolamento respiratório para o paciente que necessita e evita disseminação da tuberculose. Pacientes com formas extrapulmonares sem investigação pulmonar podem se tornar fontes de transmissão da doença.

A OMS atualizou, em 2019, o Guideline para Prevenção e Controle da tuberculose e, similar ao brasileiro, também não é claro quanto à investigação de forma pulmonar em paciente com tuberculose extrapulmonar presumida (42). Aponta que todo paciente com sinais e sintomas de tuberculose deve ser triado para diminuir risco de transmissão aos

profissionais da saúde e outros contatos. Não fornece detalhes especificando em quais formas e como. Já é bem estabelecido que, quando se deixa de diagnosticar um caso de tuberculose, pode haver transmissão entre profissionais da saúde e contatos dos pacientes infectados (43,44).

O segundo ponto remete às implicações clínicas. Para pacientes com tuberculose extrapulmonar o percurso para a confirmação microbiológica costuma ser longo e doloroso. Há necessidade de realização de procedimentos invasivos, como coleta do líquido cefalorraquidiano ou líquido pleural e biópsias em geral. Tais procedimentos requerem estrutura hospitalar adequada com centro cirúrgico e profissionais habilitados. O custo para o diagnóstico aumenta e, em locais remotos onde não há acesso aos procedimentos invasivos, o paciente segue sem possibilidade de confirmação diagnóstica. Sendo assim, a coleta de escarro é simples e acessível e pode auxiliar na confirmação microbiológica desse paciente.

Outro aspecto clínico que pode ser brevemente discutido é em relação à radiografia de tórax em pacientes EPTB. Dos pacientes que investigaram pulmão (n=97) e que foram positivos para TB (n=27) todos realizaram radiografia de tórax e 04 não apresentavam qualquer alteração. Em um estudo similar a este, em que uma coorte de 72 pacientes EPTB foi acompanhada em Seattle, EUA, imagem radiográfica normal ou alterada não mostrou relação com cultura positiva para *Mtb*. Concluiu-se que, mesmo com imagem radiográfica sem alteração, é necessário solicitar amostra respiratória.

O terceiro ponto refere-se ao incremento que o Ultra trouxe ao diagnóstico da tuberculose, principalmente nas amostras paucibacilares. Como estabelecido em meta-análise (29), o Ultra apresenta um incremento em relação à sua geração anterior o que se confirma na tabela 3 deste estudo.

5. LIMITAÇÃO DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

Nosso estudo tem limitações. Primeiramente, apesar de ser um estudo prospectivo, a análise foi realizada *post hoc*. Os pacientes foram manejados pela equipe clínica assistencial, sem interferência dos pesquisadores, já que não há diretrizes claras para a coleta de amostra respiratória no manejo de pacientes com EPTB presumida no Brasil. É provável que os pacientes com sintomas respiratórios colem mais amostra respiratória

do que aqueles sem sintomas respiratórios, levando à seleção de viés. Logo, considerando as limitações, um estudo onde houvesse possibilidade de uma amostra maior de pacientes traria dados mais robustos.

6. CONCLUSÃO

Através dos dados expostos nesse estudo onde se busca investigar fatores associados com a confirmação microbiológica de TB nos pacientes com EPTB presumida, a coleta de uma amostra respiratória pode auxiliar. Este fator foi o principal achado do estudo e aumenta em três vezes a chance de se confirmar o diagnóstico microbiológico em pacientes com EPTB presumida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Tuberculosis Report, WHO, Executive Summary. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240013131>.
2. COMMUNITIES AT THE CENTRE DEFENDING RIGHTS BREAKING BARRIERS REACHING PEOPLE WITH HIV SERVICES. Global AIDS Updates 2019. Available from: <https://reliefweb.int/report/world/communities-centre-defending-rights-breaking-barriers-reaching-people-hiv-services>
3. Health Organization W. World malaria report 2019 [Internet]. 2019. Available from: www.who.int/malaria
4. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis – DCCI. Boletim Epidemiológico de Tuberculose 2020. 2020.
5. Collateral impact of the covid 19 pandemic on TB control. Clinical Infectious Disease, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1289>
6. Maher D, Mikulencak M. What is DOTS? What is DOTS? A Guide to Understanding the WHO-recommended TB Control Strategy Known as DOTS.
7. Top-ten priority indicators for monitoring implementation of the END TB strategy at global and national levels indicator recommended target level TB treatment coverage. [Internet]. 2018. Available from: <http://www.who.int/tb>

8. THE STOP TB STRATEGY Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals. 2006.
9. Saúde M da. MANUAL DE RECOMENDAÇÕES PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE NO BRASIL V E N D A P R O I B I D A [Internet]. Available from: www.saude.gov.br/
10. Durovni B, Saraceni V, van den Hof S, Trajman A, Cordeiro-Santos M, Cavalcante S, et al. Impact of Replacing Smear Microscopy with Xpert MTB/RIF for Diagnosing Tuberculosis in Brazil: A Stepped-Wedge Cluster-Randomized Trial. *PLoS Medicine*. 2014 Dec 1;11(12).
11. Evidence gaps and research needs identified during tuberculosis policy guideline development [Internet]. 2018. Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
12. WORLD HEALTH ORGANIZATION. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2019. WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2019.
13. Mekonnen D, Derbie A, Abeje A, Shumet A, Nibret E, Biadglegne F, et al. Epidemiology of tuberculous lymphadenitis in Africa: A systematic review and meta-analysis. Vol. 14, *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2019.
14. Pang Y, An J, Shu W, Huo F, Chu N, Gao M, et al. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis among inpatients, China, 2008-2017. *Emerging Infectious Diseases*. 2019 Mar 1;25(3).
15. Peto HM, Pratt RH, Harrington TA, LoBue PA, Armstrong LR. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2006. *Clinical Infectious Diseases*. 2009 Nov;49(9):1350–7.
16. Pang Y, An J, Shu W, Huo F, Chu N, Gao M, et al. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis among inpatients, China, 2008-2017. *Emerging Infectious Diseases*. 2019 Mar 1;25(3).
17. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. Vol. 2, *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group; 2016.
18. Pezzella AT. History of Pulmonary Tuberculosis. Vol. 29, *Thoracic surgery clinics*. NLM (Medline); 2019. p. 1–17.
19. Pinto M, Trajman A, Steffen R, Entringer AP. 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. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2015 Dec 1;41(6):536–8.

20. Agizew T, Boyd R, Auld AF, Payton L, Pals SL, Lekone P, et al. Treatment outcomes, diagnostic and therapeutic impact: Xpert vs. Smear. A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2019 Jan 1;23(1):82–92.
21. Kohli M, Schiller I, Dendukuri N, Dheda K, Denkinger CM, Schumacher SG, et al. Xpert® MTB/RIF assay for extrapulmonary tuberculosis and rifampicin resistance. Vol. 2018, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2018.
22. Manual Nacional de VIGILÂNCIA LABORATORIAL da TUBERCULOSE e outras MICOBACTÉRIAS Brasília, DF 2008 MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica [Internet]. 2008. Available from: <http://www.saude.gov.br/bvs>
23. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Sistema de informação de agravos de notificação. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. 1 Edição [Internet]. 2011;(61):284. Available from: <http://www.saude.gov.br/bvs> <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0>
24. Kidenya BR, Kabangila R, Peck RN, Mshana SE, Webster LE, Koenig SP, et al. Early and Efficient Detection of Mycobacterium tuberculosis in Sputum by Microscopic Observation of Broth Cultures. *PLoS ONE*. 2013 Feb 28;8(2).
25. Wang G, Wang S, Jiang G, Yang X, Huang M, Huo F, et al. Xpert MTB/RIF Ultra improved the diagnosis of paucibacillary tuberculosis: A prospective cohort study. *Journal of Infection*. 2019 Apr 1;78(4):311–6.
26. Zar HJ, Workman LJ, Prins M, Bateman LJ, Mbhele SP, Whitman CB, et al. Tuberculosis diagnosis in children using Xpert Ultra on different respiratory specimens. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2019 Dec 15;200(12):1531–8.
27. Gomes T, Reis-Santos B, Bertolde A, Johnson JL, Riley LW, Maciel EL. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil: a hierarchical model [Internet]. 2014. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/9>
28. Zhang M, Xue M, He J qing. Diagnostic accuracy of the new Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculosis disease: A preliminary systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020 Jan 1;90:35–45.

29. Zhang M, Xue M, He J qing. Diagnostic accuracy of the new Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculosis disease: A preliminary systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020 Jan 1;90:35–45.
30. Nota de recomendações do uso do TRM TB Ultra. Ministério da saúde, 2019. Available from: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/16/nota-2---Atualizacao-das-recomendacoes-sobre-o-diagnostico-laboratorial-da-tuberculose.pdf>
31. Chakravorty S, Marie Simmons A, Rowneki M, Parmar H, Cao Y, Ryan J, et al. The New Xpert MTB/RIF Ultra: Improving Detection of Mycobacterium tuberculosis and Resistance to Rifampin in an Assay Suitable for Point-of-Care Testing [Internet]. 2017. Available from: <http://mbio.asm.org/>
32. Churchyard G, Kim P, Shah NS, Rustomjee R, Gandhi N, Mathema B, et al. What We Know about Tuberculosis Transmission: An Overview. Vol. 216, *Journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press; 2017. p. S629–35.
33. D'Agata EMC, Wise S, Stewart A, Lefkowitz LB. Nosocomial Transmission of Mycobacterium tuberculosis From an Extrapulmonary Site . *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2001 Jan;22(1):10–2.
34. Hutton MD, Stead WW, Cauthen GM, Bloch AB, Ewing WM. Nosocomial Transmission of Tuberculosis Associated with a Draining Abscess [Internet]. 1990. Available from: <http://jid.oxfordjournals.org/>
35. Matlow AG, Harrison A, Monteath A, Roach P, Balfe JW. Nosocomial Transmission of Tuberculosis (TB) Associated With Care of an Infant With Peritoneal TB. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2000 Mar;21(3):222–3.
36. Agerton T, Valway S, Gore B, Plikaytis B, Woodley C, Onorato I. Transmission of a Highly Drug-Resistant Strain (Strain W1) of Mycobacterium tuberculosis Community Outbreak and Nosocomial Transmission via a Contaminated Bronchoscope [Internet]. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/>
37. Larson JL, Lambert L, Stricof RL, Driscoll J, McGarry MA, Ridzon R. Potential Nosocomial Exposure to Mycobacterium tuberculosis From a Bronchoscope . *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2003 Nov;24(11):825–30.
38. Schirmer P, Renault CA, Holodniy M. Is spinal tuberculosis contagious? Vol. 14, *International Journal of Infectious Diseases*. 2010.
39. Shaw JA, Diacon AH, Koegelenberg CFN. Tuberculous pleural effusion. Vol. 24, *Respirology*. Blackwell Publishing; 2019. p. 962–71.

40. Zurcher 1 § K, Ballif M, Kiertiburanakul S, Chenal H, Yotebieng M, Grinsztejn B, et al. Diagnosis and clinical outcomes of extrapulmonary tuberculosis in antiretroviral therapy programmes in low- and middle-income countries: a multicohort study. 2019; Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jia2.25392/full>
41. Gerberding JL, Snider DE, Popovic T, Solomon SL, Bernhardt JM, Parker MS, et al. Centers for Disease Control and Prevention Lead Visual Information Specialist.
42. Who guidelines on TB infection prevention and control 2019 updates.
43. Medrano BA, Salinas G, Sanchez C, Miramontes R, Restrepo BI, Haddad MB, et al. A Missed Tuberculosis Diagnosis Resulting in Hospital Transmission. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2014 May;35(5):534–7.
44. An outbreak of mDR TB Edlin 1992. *New England Journal*, 1992. Vol 326, n.03.

8. ANEXOS E APÊNDICES

8.1 Anexo/Apêndice 1: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Página 1 de 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Participante Sintomáticos Respiratórios)

Projeto: Novo teste diagnóstico para descartar o diagnóstico de tuberculose”

Você está sendo convidado(a) para participar desta pesquisa porque tem tosse e está fazendo exames para saber se tem ou não uma doença chamada **tuberculose**. A tuberculose é causada por um bichinho com o nome de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) em todo o mundo. A maioria das pessoas tem tuberculose no pulmão, por isso quando o doente com tuberculose tosse pode passar a doença para outras pessoas. Hoje em dia o principal exame para descobrir a tuberculose é o exame de escarro/catarro. A tuberculose tem cura e o tratamento é de no mínimo 6 meses. As pessoas que moram na mesma casa ou ficam muito tempo juntas a alguém com tuberculose, devem ser avaliadas porque podem ter sido infectadas ou não com a bichinho da tuberculose. Sabe-se que algumas pessoas que se infectam com o bichinho da tuberculose podem um dia ficar doentes, e outras podem passar anos ou a vida inteira e nunca adoecerem. Muitos pesquisadores vêm estudando porque isso acontece. Assim, um maior conhecimento de toda a tuberculose é necessário.

O estudo que você está sendo convidado para participar tem o objetivo de estudar um novo teste para descartar o diagnóstico da tuberculose. No futuro, esse novo teste poderá informar rapidamente quem não tem tuberculose, e evitar perda de tempo, exames caros e tratamentos errados.

Resumo do estudo:

Esse projeto vai estudar um novo teste para tuberculose em pessoas com sintomas de tuberculose, contatos de pessoas com tuberculose e voluntários saudáveis. **No seu caso, você é uma pessoa com sintomas de tuberculose.** O estudo é uma parceria entre os pesquisadores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Instituto de Medicina Social, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e Hospital *Addenbrookes, Cambridge, Core Biochemical Assay Laboratory*.

Todo o atendimento médico, de enfermagem, coletas de sangue, processamento/congelamento e armazenamento das amostras serão realizados nas instalações da FMT-HVD. Periodicamente as amostras de sangue congeladas serão enviadas para a realização do novo teste para tuberculose no *Hospital Addenbrookes, Cambridge, Core Biochemical Assay Laboratory* localizado na Inglaterra.

A sua participação neste estudo:

A sua participação é conceder informações pessoais (como por exemplo sexo, moradia e idade), informações de saúde e amostras de sangue para congelamento e realização do novo teste para tuberculose. Também serão realizados os exames: teste anti-HIV (vírus da imunodeficiência humana), coleta de catarro, radiografia de tórax e hemograma (quando necessário). Se você já for portador do HIV, um exame de contagem das suas células de defesa e exame de carga viral do HIV serão feitos, caso você não tenha feito nos últimos 6 meses, conforme recomendação do Ministério da Saúde.). Ressaltamos que o exame de HIV será realizado após seu consentimento e esclarecimento de todas as suas dúvidas. O resultado será informado por um profissional da saúde treinado em uma sala reservada seguindo o protocolo do Ministério da Saúde; resguardando o sigilo do resultado desse exame. Em caso de HIV positivo iremos realizar os encaminhamentos necessários para início do tratamento em alguma unidade de saúde do SUS próxima de sua casa ou na própria FMT-HVD, conforme recomendação do Ministério da Saúde. O exame de sangue IGRA (teste de liberação de Interferon) é para descobrir se você já foi infectado(a) ou não pelo bichinho da tuberculose. Esse exame já foi recomendado pelo Ministério da Saúde e liberado pela Anvisa, mais ainda não é feito no Sistema Único de Saúde (SUS).

Se o seu exame de escarro/catarro der positivo para o bichinho da tuberculose, nós (equipe de pesquisa) vamos lhe oferecer tratamento com os remédios conforme recomendação do Ministério da Saúde, esse tratamento poderá ser realizado na FMT-HVD, ou se desejar, você será encaminhado para uma unidade de saúde próxima de sua casa no mesmo dia para iniciar o tratamento, garantindo a continuação do mesmo. Todos os resultados e procedimentos serão ofertados conforme as orientações do Ministério da Saúde.

Se você for mulher e tiver potencial para engravidar, nós, a equipe do estudo, solicitaremos que você forneça urina para fazermos um teste de gravidez no início do estudo. Você não poderá participar do estudo se estiver grávida ou amamentando.

Rubrica do(a) Participante da pesquisa ou responsável legal: _____ Rubrica do pesquisador responsável ou do profissional nomeado para aplicação do termo: _____ Rubrica da Testemunha (se aplicável): _____

Custos da pesquisa e compensação:

Não há nenhum custo para que você participe desta pesquisa. Além disso, os pesquisadores tentarão minimizar as suas despesas ressarcindo-o(a) por gastos com transporte e alimentação no dia que vier à consulta do estudo. Se precisarmos que você venha aqui em alguma ocasião só por conta do estudo, reembolsaremos toda e qualquer despesa decorrente ao seu deslocamento para instituição, como por exemplo, seu transporte e alimentação assim como do seu acompanhante, caso necessário.

Todos os gastos com os procedimentos realizados no projeto serão pagos pelo próprio estudo em parceria com Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Instituto de Medicina Social, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e Hospital *Addenbrookes, Cambridge, Core Biochemical Assay Laboratory*.

Riscos:

Os riscos para participação são mínimos. A coleta de amostras de sangue pode dar dor, vermelhidão, inchaço ou irritação no local onde foi coletado o sangue; isso acontece devido ao uso da agulha e da cordinha (garrote) usados na coleta de sangue. Todo o material para coleta de sangue será novo e descartável. Todos os procedimentos serão realizados pela equipe de estudo treinada em um local reservado e apropriado. Caso você passe mal, tenha alguma dúvida ou se você se sinta constrangido(a) com a coleta das amostras, à equipe do estudo estará pronta para lhe atender e tentará minimizar ao máximo o seu desconforto.

Caso você tenha algum dano ou desconforto relacionado diretamente ou indiretamente à sua participação nesse estudo, você receberá todo o suporte da equipe de pesquisa, assim como indenização devido a eventuais danos decorrentes da pesquisa. A equipe está disponível para auxiliá-lo(a) independentemente da sua participação neste estudo. **Você terá garantia de assistência de saúde integral e gratuita durante todo o período de estudo.**

Benefícios:

Não há nenhum benefício direto em participar. Sua participação talvez ajude outras pessoas no futuro que estejam passando pelo mesmo processo de diagnóstico que você está passando atualmente. Pretendemos publicar nossos resultados para que os médicos, no futuro, possam saber quando e como usar esse novo exame de sangue.

Participação voluntária:

A sua participação neste estudo é **voluntária, ou seja, você pode participar ou não deste estudo**. Se você escolher não participar, não haverá nenhum prejuízo para você, você continuará tendo o mesmo atendimento que sempre teve nesta unidade de saúde. Caso aceite, você pode desistir de participar a qualquer momento, assim como de mantê-lo ou não as suas amostras de sangue congeladas e guardadas. Você não precisa explicar o porquê você não quer mais participar, deve apenas comunicar à equipe do estudo que está saindo. Se quiser sair do estudo garantimos a continuação do seu tratamento (se confirmar tuberculose), caso você esteja tratando com a equipe de estudo. Garantimos a você o direito a assistência de saúde integral e gratuita, mesmo que não queira participar do estudo e/ou mesmo que não queria mais manter as suas amostras armazenadas.

Uso do Material Coletado, Dados e Confidencialidade:

Todo material coletado será mantido em local seguro. Nenhuma amostra coletada será identificada com o nome, usaremos códigos para manter a sua confidencialidade e o sigilo das informações. As suas informações demográficas (exemplos: idade, sexo, onde nasceu, e outras perguntas) e informações clínicas (tosse, febre, remédios e outras), perguntadas durante as consultas de enfermagem/médica, serão utilizadas para análises deste estudo. Estas informações serão registradas em fichas de dados pela equipe do estudo, e armazenadas em um sistema para registro de dados no Brasil. Asseguramos que nenhuma das suas informações pessoais será fornecida e sua confidencialidade será mantida também através do uso de códigos. **O armazenado das amostras será por até 05 anos, após esse período as amostras serão destruídas.** Reforçamos que qualquer pesquisa futura com esses dados ou amostras deverão ser encaminhadas e aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e se for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, antes de serem iniciadas.

Rubrica do(a) Participante da pesquisa ou responsável legal: _____ Rubrica do pesquisador responsável ou do profissional nomeado para aplicação do termo: _____ Rubrica da Testemunha (se aplicável): _____
Versão_2.0_TCLE_SR_25_abril_2018

Precisamos saber se você, aceita que suas amostras sejam armazenadas. Por favor, marque SIM ou NÃO abaixo:

() SIM, autorizo a guarda do material () NÃO, autorizo a guarda do material.

Em caso de dúvida poderá entrar em contato com:**Pesquisador Responsável:****Dra. Anete Trajman**

Professora Visitante, Universidade do Estado do Rio de Janeiro

e-mail: atrajman@gmail.com

telefone: (21)98218-9194

Co-pesquisador Responsável:

Dr. Marcelo Cordeiro dos Santos.

Médico infectologista, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

Av. Pedro Teixeira, Dom Pedro Nº 25. CEP 69040-000 – Manaus - AM

E-mail: marcelocordeiro.br@gmail.com/ Telefone: (92) 2127- 3555.

Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa:

Os comitês de ética existem para proteger os participantes da pesquisa. Pesquisas com seres humanos só podem ser feitas se aprovadas nesses comitês. Se você tem alguma dúvida sobre seus direitos como participante de uma pesquisa ou se quiser fazer alguma reclamação, pode procurar os comitês de ética nos contatos abaixo.

Contato dos Comitê de Ética em Pesquisa (dependerá do local):

Universidade do Estado do Rio de Janeiro- Instituto de Medicina Social

Rua São Francisco Xavier, 524 – Maracanã, 20550-900 – Rio de Janeiro – RJ

Sala 7003 (7º andar) – Bl. D (Anexo à secretaria acadêmica)

Tel: (21) 2334-0235 r. 108

Email: *cep-ims@ims.uerj.br*

Horário de atendimento ao público: segundas-feiras, quartas-feiras e sexta-feiras: 10h às 12:30 e 13:30 às 16h.

Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

Av. Pedro Teixeira, Dom Pedro Nº 25. CEP 69040-000

Prédio: Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, terceiro andar

Telefone (92) 2127-3572

Email: *cep@fmt.am.gov.br*

Horário de Funcionamento: 2a a 6a de 08 às 14h

Caso você tenha lido e entendido as informações neste termo de consentimento – ou elas tenham sido lidas para você – e caso concorde em participar voluntariamente deste estudo, você e o pesquisador/ou alguém nomeado por ele assinarão duas vias originais deste documento. Uma via assinada por você e pelo pesquisador/ou alguém nomeado por ele ficará com você e a outra via será guardada em local seguro na FMT-HVD. Ao assinar este documento, você não abrirá mão de nenhum direito legal, assim como poderá sair do estudo a qualquer momento sem prejuízo nenhum. Será também necessário que você e o pesquisador rubricuem todas as páginas deste termo, assegurando que todas as páginas foram lidas, o que garante ainda mais a sua proteção.

Li ou leram para mim esse termo e concordo em participar da pesquisa,_____
Nome do(a) participante (letra legível)____/____/____
Data_____
Assinatura do(a) participante_____
Hora_____
Nome do pesquisador responsável ou do profissional nomeado para aplicação do termo (letra legível) Data

____/____/____

Rubrica do(a) Participante da pesquisa ou responsável legal: _____ Rubrica do pesquisador responsável ou do profissional nomeado para aplicação do termo: _____ Rubrica da Testemunha (se aplicável): _____
Versão_2.0_TCLE_SR_25_abril_2018

Página 4 de 4

Assinatura pesquisador responsável ou do profissional nomeado para aplicação do termo_____
Hora_____
Nome da testemunha imparcial (letra legível)____/____/____
Data_____
Assinatura da testemunha imparcial_____
Hora

8.2 Anexo/Apêndice 2: Ficha de captura de dados clínicos (CRF)

Rubrica do(a) Participante da pesquisa ou responsável legal: _____ Rubrica do pesquisador responsável ou do profissional nomeado para aplicação do termo: _____ Rubrica da Testemunha (se aplicável): _____ Versão_2.0_TCLE_SR_25_abril_2018

7.2 APÊNDICE 2: QUESTIONÁRIO DE INVESTIGAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL



Página 1 de 3

INVESTIGAÇÃO CLÍNICA

Sintomático respiratório e Extrapulmonar

Participante ID: _____ **Grupo:** TB pulmonar TB extrapulmonar outros

HISTÓRIA CLÍNICA

Iniciais: _____ Prontuário: _____ Data da avaliação: _____

Sexo ao nascimento: Masculino Feminino

Data de nascimento (DD/MM/AA):

Período menstrual: Normal Menopausa Não se aplica

Quando foi o primeiro dia do seu último período menstrual?

(Se a data não for conhecida aproximar para o dia 15 do mês).

RAÇA:

Branco Negro Amarelo (asiático) Pardo Índio Não sabe

NÍVEL EDUCACIONAL: (Se participante for analfabeto, favor checar TCLE testemunha).

Alfabetizado Analfabeto Por quantos anos você frequentou a escola?

SALÁRIO MENSAL (APROXIMADO, ANTES DA TB):

Mais que um salário mínimo () Igual ou menor que um salário mínimo ()

EXAME FÍSICO

Peso: _____ Kg Altura: _____ cm Temperatura: _____ °c

FR: _____ irpm FC: _____ bpm PA: _____ x _____ mmHg

Circunferência do braço: _____ cm Outros (especifique): _____

USO DE CIGARRO

Fuma atualmente Costumava fumar Nunca fumou

Quantos cigarros por dia (ou média) fumou ou fumava? _____

Há quantos anos você fuma ou fumou? _____

Com que idade começou a fumar? _____

Com que idade parou de fumar? _____

USO DE BEBIDA ALCOOLICA

Bebe atualmente Costumava beber Nunca bebeu

Quantos drinks alcoólicos você consumiu nos últimos 7 dias? _____

Em qual idade você começou a beber? _____

Em qual idade você parou de beber? _____

USO DE DROGAS

Usa atualmente Costumava usar Nunca usou

Que tipo de
drogas?

Maconha Cocaína Crack Haxixe Ecstasy Heroína Não sabe Outro _____

SINTOMAS

Tosse Duração (em dias):

Fadiga

Perda de peso

Sudorese noturna

Falta de ar

Febre

Dor torácica

Alteração na ausculta pulmonar

RADIOGRAFIA DE TÓRAX

Foi possível a realização do exame? Sim Não

Data da realização: ____/____/____

Existe alguma
cavitação?

Sim

Não

Impossível de determinar pelo exame

Presença de adenopatia
mediastinal?

Sim

Não

Impossível de determinar pelo exame

Presença de efusão/derrame
pleural?

Sim

Não

Impossível de determinar pelo exame

Presença de
opacidade/condensação?

Sim

Não

Impossível de determinar pelo exame

Presença de padrão miliar?

Sim

Não

Impossível de determinar pelo exame

Presença de calcificação e
fibrose?

Sim

Não

Impossível de determinar pelo exame

RESULTADO DO QUANTIFERON

O exame foi realizado? Sim Não Não se aplica Data do teste: _____

Indique o resultado: Positivo Negativo Indeterminado

Concentração Nil _____ TB1Ag: _____ TB2Ag: _____ Mitógeno: _____

8.3 Anexo/Apêndice 3: Documento de anuência do estudo



GOVERNO DO ESTADO DO
AMAZONAS

SOLICITAÇÃO DE ANUÊNCIA

Para: *Dr. Wuelton Marcelo Monteiro*
Diretoria de Ensino e Pesquisa FMT/HVD

Manaus, 30 de novembro de 2017

Senhor Dr. Wuelton Marcelo Monteiro, Diretor de Ensino e Pesquisa FMT/HVD,

Eu *Marcelo Cordeiro dos Santos*, pesquisador responsável pelo estudo intitulado “**Novo teste diagnóstico para descartar o diagnóstico de tuberculose**”, venho solicitar a Vossa Senhoria ANUÊNCIA para executar a pesquisa, junto à Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, na Gerência de Tuberculose; conforme descrito no protocolo em anexo. Na expectativa de um pronunciamento favorável, antecipadamente agradeço.

Atenciosamente,

Dr. Marcelo Cordeiro dos Santos (Pesquisador Responsável)

Termo de Anuência

Considerando que esta instituição possui condições de atender à solicitação da pesquisadora, minha manifestação é pelo DEFERIMENTO, desde que se cumpram todos os requisitos éticos para a realização da pesquisa em tela.

Manaus, 30 de novembro de 2017

Dr. Wuelton Marcelo Monteiro
Diretoria de Ensino e Pesquisa FMT/HVD

Avenida Pedro Teixeira N° 25, Bairro D. Pedro
CEP:69.040-000 - Manaus - Amazonas, Brasil
FONE (92) 2127-3436 / PABX (92) 2127-3555
E-mail: assessoratecnica@fmt.am.gov.br



FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL
DOCTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Secretaria de
Estado da Saúde

8.4 Anexo/Apêndice 4: Procedimento Operacional Padrão (POP)

8.4.1 POP 1. Recrutamento de participante de estudo

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO Protocolo: Protocolo: Biomarcadores para exclusão do diagnóstico de tuberculose ativa: um coorte prospectivo (Immiprint®)	
Título: Recrutamento de participante de estudo		POP.CLIN.008
Emissão: 23 / 05 / 2018	Revisão: ____ / ____ / ____	Nº 001

1. OBJETIVO

Este documento tem por objetivo descrever e padronizar os procedimentos para recrutamento e seleção de participantes de estudos envolvendo seres humanos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, envolvidos no protocolo.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se aos profissionais da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, envolvidos com o protocolo.

3. DEFINIÇÃO/SIGLAS

Coordenador de Estudo: Pessoa apropriadamente experiente apontada pelo investigador principal para programar, treinar, executar, verificar, analisar e corrigir o processo de trabalho no centro de pesquisa.

TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido): É um documento que informa, de forma escrita em linguagem clara e objetiva, e esclarece o potencial participante e/ou seu responsável legal de maneira que ele(a) e/ou seu representante legal possa tomar sua decisão de forma justa e sem constrangimentos sobre a sua participação na pesquisa para a qual foi convidado. É uma proteção legal e moral do pesquisador e do pesquisado, visto ambos estarem assumindo responsabilidades, e é uma forma de garantir formalmente que os direitos do participante serão respeitados.

TALE (termo de assentimento livre e esclarecido): Documento elaborado em linguagem acessível para os menores ou legalmente incapazes, por meio do qual, após os potenciais participantes serem devidamente esclarecidos, explicitarão sua anuência em participar da pesquisa, sem o prejuízo do consentimento dos seus responsáveis legais.

Participante da pesquisa: É um ser humano, indivíduo que depois de informado(a) e esclarecido(a) sobre os objetivos, metodologia, riscos e benefícios do estudo decide voluntariamente em participar de uma pesquisa clínica.

Recrutamento: É o processo de busca de pacientes **potencialmente** elegíveis para um projeto de pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

O recrutamento de participantes para estudos envolvendo seres humanos é de responsabilidade do investigador, podendo ser delegada à equipe do estudo, como coordenador do estudo, médico, enfermeiro do estudo ou outros profissionais treinados para tal.

5. FLUXOGRAMAS

N/A

6. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

O recrutamento dos possíveis participantes de pesquisa deverá seguir as seguintes especificações:

- Só serão recrutados sujeitos para projeto de pesquisa já previamente aprovado pelo Sistema CEP/CONEP e pela ANVISA, se necessário.
- De acordo com o protocolo de pesquisa, estabelecer o perfil do sujeito de pesquisa, fundamentado nos critérios de elegibilidade.
- Com base na especificação acima, procurar identificar os possíveis sujeitos de pesquisa através:
 - do Banco de Dados do Laboratório de Tuberculose;
 - de material visual, como cartazes, informativos, previamente aprovados pelo Sistema CEP/CONEP;
 - informação constante aos pesquisadores, médicos e demais profissionais que atuam no unidade de saúde das características necessárias para os sujeitos de pesquisa do estudo;
 - de contato telefônico ou por e-mail com pesquisadores, médicos e demais profissionais de saúde que atuem em outras unidades da FMT-HVD ou outras instituições, informando as características necessárias para os pacientes participarem do projeto.
- Fazer o contato - por e-mail, correspondência ou telefone (quando não for solicitado sigilo no prontuário) com os pacientes identificados como possíveis participantes do estudo, informá-los sobre o estudo que está sendo realizado e suas características principais (objetivo, duração do estudo, esquema de visitas, gratuidade e voluntariado, etc.), respeitando os aspectos de confidencialidade do estudo. Registrar o contato realizado em planilha específica, a ser elaborada pelo coordenador do estudo.
- Se de fato, os pacientes preencherem os critérios mínimos necessários ao projeto, agendar uma visita de avaliação com um profissional do projeto da FMT-HVD. Nessa visita os critérios mínimos para o estudo serão novamente verificados e caso o paciente seja potencialmente elegível e concorde em participar do estudo, haverá a aplicação

do TCLE específico (ver POP CLIN 001 - Obtenção de termo de consentimento livre e esclarecido) ou haverá o agendamento de uma nova consulta específica do estudo.

- Durante a consulta de avaliação, deve ficar claro que a recusa em participar do estudo não influenciará seu atendimento e tratamento de rotina, se for o caso.

7. ANEXOS

N/A

8. FORMULÁRIOS UTILIZADOS

N/A

9. REFERÊNCIAS

BRASIL, Resolução N° 466 de 12 de dezembro de 2012, Publicada no DOU nº 12 – quinta-feira, 13 de junho de 2013 – Seção 1

10. DISTRIBUIÇÃO

ÁREA	No. DE CÓPIAS
Enfermaria de Pesquisa Clínica da FMT-HVD (PesClin)	01

11. HISTÓRICO DE REVISÕES

No. DA REVISÃO	DATA	ITEM ALTERADO	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO	RESP. PELA ALTERAÇÃO	JUSTIFICATIVA

12. DESATIVAÇÃO

DATA	RESPONSÁVEL	MOTIVO DA DESATIVAÇÃO

8.4.2 POP 2. Obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e do Termo de Assentimento

	<p align="center">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO</p> <p align="center">Protocolo: Protocolo: Biomarcadores para exclusão do diagnóstico de tuberculose ativa: um coorte prospectivo (Immiprint®)</p>	
<p>Título: Obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e do Termo de Assentimento.</p>	<p align="right">POP.CLIN.001</p>	
<p>Emissão: 23 / 05 / 2018</p>	<p align="center">Revisão: ____ / ____ / ____</p>	<p align="right">Nº 001</p>

1. OBJETIVO

Padronizar o processo de obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido com base nas resoluções vigentes que concernem à pesquisa clínica, no ICH/GCP, 1996 e no Documento das Américas, 2005 e nas respectivas atualizações.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se aos profissionais do protocolo *Immiprint®* da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

3. DEFINIÇÃO/SIGLAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
Patrocinador	Indivíduo, empresa, instituição ou organização responsável pela implementação, gerenciamento e/ ou financiamento de um estudo clínico.
Representante Legal	Indivíduo, organização jurídica ou outro corpo legalmente autorizado através de documento homologado, responsável pelo consentimento, em nome do paciente, para viabilizar sua participação no estudo clínico.
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido - documento que contém todas as informações relevantes relacionadas ao projeto de pesquisa, que vai dar ao voluntário os subsídios necessários para a sua decisão de participação no estudo.
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido – documento elaborado em linguagem acessível para os menores ou legalmente incapazes, por meio do qual explicitarão sua anuência em participar da pesquisa,

sem o prejuízo do consentimento dos seus responsáveis legais, contendo todas as informações do TCLE.

Testemunha Imparcial

Indivíduo independente da pesquisa, que não possa ser indevidamente influenciado por pessoas envolvidas no estudo, que acompanhe o processo de obtenção do consentimento livre e esclarecido, caso o paciente ou seu representante legal não saibam ler.

4. RESPONSABILIDADES

A implantação e o treinamento deste POP cabem ao coordenador responsável pelo protocolo ou a um profissional por ele designado.

A responsabilidade pela aplicação do TCLE/TALE é do pesquisador principal do estudo, entretanto a sua aplicação pode ser realizada por membros da equipe do estudo, conforme delegação do pesquisador principal do respectivo estudo.

5. FLUXOGRAMAS

Não aplicável.

6. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

A aplicação do TCLE/TALE é a primeira conduta frente a um voluntário que tenha perfil adequado para participar de um projeto de pesquisa. O participante não poderá realizar nenhum procedimento do estudo antes de ser informado sobre a pesquisa, concordar em participar e antes da obtenção do consentimento/assentimento.

O pesquisador deverá elaborar o TCLE/TALE de acordo com as exigências éticas e regulatórias ou utilizar um modelo fornecido pelo patrocinador, adequando-o às exigências do seu laboratório ou instituição, ou fazer outras alterações que considerar necessárias a fim de atender as normas relativas à pesquisa clínica.

O TCLE/TALE e as respectivas atualizações deverão ser submetidas à análise ética pelo CEP local e pela CONEP, quando aplicável. No caso de estudos multicêntricos, o documento somente poderá ser analisado pelo CEP das instituições participantes após a aprovação pelo CEP do centro coordenador e pela CONEP, se aplicável. Em todos os casos, o TCLE/TALE só poderá ser utilizado após as devidas aprovações.

6.1 Obtenção do consentimento (maiores de idade):

1. Uma vez que o potencial voluntário seja identificado, o pesquisador, ou profissional por ele delegado, apresentará o estudo e o TCLE correspondente. Deverá ser dado ao voluntário e/ou ao representante legal tempo suficiente para ler, discutir, questionar e

refletir sobre sua decisão em participar ou não do projeto de pesquisa, podendo inclusive, levar o TCLE (sem nenhuma assinatura) para casa caso queira conversar com sua família e/ou médico pessoal. Quando o voluntário ou o representante legal levar o TCLE para casa, é proibido recebê-lo já assinado. Todas as assinaturas devem ser obtidas na instituição, diante do pesquisador ou profissional delegado.

2. Em seguida o pesquisador principal ou pessoa por ele delegada deverá fazer uma revisão do TCLE juntamente com o voluntário e/ou com o representante legal e de forma detalhada explicar sobre todos os elementos contidos no documento.

3. Enfatizar para o voluntário/ representante legal que ele pode retirar seu consentimento de participação a qualquer momento, sem que isto lhe traga nenhum risco, ônus ou prejuízo em seu tratamento. No caso de estudos em que há a guarda de amostras biológicas para uso futuro, enfatizar que o voluntário tem a opção de retirada do consentimento de guarda de amostras e ainda optar por continuar ou não participando das visitas do estudo.

4. O pesquisador principal ou pessoa por ele delegada deverá certificar-se de que o voluntário/ representante legal tenha entendido totalmente o TCLE. Caso o participante/responsável legal não possa ler ou escrever, ficará sob responsabilidade do pesquisador ou pessoa por ele delegada, explicar totalmente o TCLE e fazer a verificação da compreensão do mesmo pelo paciente na presença de uma testemunha imparcial.

5. Em pesquisas envolvendo crianças e adolescentes, portadores de perturbação ou doença mental e sujeitos em situação de substancial diminuição em sua capacidade de consentimento, deverá haver justificativa clara da escolha dos sujeitos da pesquisa, no projeto aprovado pelo CEP, e cumprir as exigências do consentimento livre e esclarecido, através dos representantes legais dos referidos sujeitos, sem suspensão do direito de informação do indivíduo, no limite de sua capacidade.

6. Após o consentimento em participar do estudo, o participante da pesquisa (ou testemunha imparcial ou responsável legal) e, posteriormente, o pesquisador ou pessoa por ele delegada deverão assinar e datar 2 vias (ou mais, caso o patrocinador exija) do TCLE. Se necessário, a hora da assinatura deverá também ser registrada. É vetado ao pesquisador tentar ajudar o voluntário, o representante legal ou a testemunha datando o TCLE ou escrevendo seu nome em letra de fôrma.

7. Todas as páginas do TCLE deverão ser rubricadas pelo participante (e/ou testemunha imparcial ou responsável legal) e pelo profissional responsável pela obtenção do consentimento.

8. Se o participante de pesquisa/representante legal for analfabeto ou estiver impossibilitado de assinar o TCLE, ele (a) deverá colocar sua identificação dactiloscópica no campo da assinatura. A testemunha imparcial ou representante legal deverá registrar o nome do participante da pesquisa e a data, nos campos específicos, assinar a última página, no campo da testemunha imparcial ou representante legal, e rubricar todas as páginas do documento.

9. O nome do voluntário, do pesquisador e, quando aplicáveis, da testemunha e do representante legal, assim como a data da assinatura do TCLE devem ser escritos com letra legível ou de fôrma de maneira a ser possível a sua identificação.

10. Não é necessário que o voluntário ou o representante legal analfabeto rubrique as páginas do termo, nesse caso, poderá escrever suas iniciais ou a testemunha imparcial deve rubricá-las.

11. Uma via do TCLE rubricado e assinado por todas as partes deverá ser entregue ao sujeito e a outra ao coordenador do estudo, que arquivará o documento nos arquivos do estudo. Uma cópia deste TCLE assinado será arquivada no prontuário do paciente.

12. No caso em que houver necessidade de representante legal e/ou de testemunha imparcial, deve-se registrar o número da identidade abaixo do campo “Nome” respectivo.

6.2 Obtenção do assentimento (menores de idade) e do consentimento dos respectivos responsáveis legais:

1. Uma vez que o voluntário menor de idade tenha sido identificado, convide-o (a) para participar do estudo e do processo de assentimento. Pelo menos um dos pais (aquele que normalmente acompanha o menor de idade na clínica) ou outro responsável legal devem participar desse processo.

2. Caso o responsável legal não seja o pai ou a mãe do voluntário menor de idade, é necessário verificar o documento de tutela oficial antes de assinar o termo de assentimento/consentimento. Deve-se retirar uma cópia deste documento, e arquivá-lo junto com o termo de consentimento.

3. Explicar o estudo para a criança/adolescente em uma terminologia leiga, de acordo com a idade.

4. Após leitura e explicação do termo de assentimento, se o participante assentir em ser incluído no estudo, solicitar que assine (caso já saiba escrever) ou forneça impressão dactiloscópica no formulário de assentimento, no campo “assinatura do participante”. Duas cópias do termo de assentimento devem ser assinadas. O pai ou a mãe, ou outro responsável legal também devem assinar e datar o documento, igualmente o profissional que realizou a aplicação do termo de assentimento.

5. Todas as páginas deverão ser rubricadas pelo responsável legal, pelo pesquisador e pelo menor de idade. Caso o menor de idade não saiba fazer uma rubrica, poderá escrever suas iniciais neste campo.

6. Se o menor de idade for analfabeto, ou ainda não souber ler/escrever, o pai ou a mãe, ou o representante legal, devem escrever o nome do voluntário com letra legível (se possível, de fôrma) e datar, no termo de assentimento. É vetado ao profissional que estiver aplicando o termo escrever o nome do voluntário e datar o termo de assentimento por ele.

7. Se o responsável legal pelo menor de idade for analfabeto, uma testemunha imparcial deverá estar presente durante o processo de consentimento informado e vai assinar o TCLE e rubricar as páginas.

8. O nome do responsável legal do menor de idade, e da testemunha imparcial (se houver) devem ser registradas abaixo do campo “Nome” respectivo.

9. O TCLE para os responsáveis pelos menores de idade deverá ser apresentado ao responsável legal que normalmente acompanha o menor de idade na clínica. Para a aplicação do termo de consentimento do responsável legal devem-se seguir os procedimentos descritos no item 6.1 deste POP.

10. Se a criança se recusar, então ela não deverá ser incluída no estudo, mesmo com o consentimento dos pais ou do representante legal. A pessoa que aplica o termo deve dizer isso claramente para o menor de idade.

6.3 Procedimentos gerais:

1. Uma via do TCLE/TALE assinado por todas as partes deverá ser entregue ao participante. A outra via deverá ficar com o profissional que aplicou o termo e será arquivada nos arquivos do estudo. Uma cópia do TCLE/TALE assinado será arquivada no prontuário do paciente, conforme regra da instituição.

2. Todo o processo de obtenção do consentimento/assentimento deve ser devidamente registrado no prontuário do paciente, incluindo o título da pesquisa e a versão do TCLE/TALE.

3. O controle da aplicação do TCLE/TALE será feito pelo enfermeiro/coordenador do estudo após cada visita de triagem.

4. A hora de assinatura do TCLE/TALE será anotada pelo participante ou testemunha imparcial/representante legal, caso seja exigido pelo estudo.

5. Qualquer erro relevante na aplicação do TCLE (por exemplo: ausência de rubrica em qualquer página, ausência de data, erro na data, falta de assinatura, falta de impressão dactiloscópica, sobrenome abreviado, ausência de testemunha imparcial quando era necessário) identificado após o processo de aplicação do mesmo deve ser comunicado à coordenadora do estudo. Devem-se seguir as instruções abaixo:

5.1 Convidar o participante para novo processo de obtenção de TCLE/TALE, esclarecendo que este procedimento será feito para fins éticos. O novo termo de consentimento/assentimento deverá ser arquivado junto com o anterior. Nenhum TCLE/TALE deve ser jogado fora. Na obtenção do novo TCLE/TALE, a data sempre deve ser a corrente, nunca usar datas retroativas. O motivo para aplicação do novo TCLE/TALE deve ser documentado.

5.2 Se necessário, comunicar ao CEP local da instituição, esclarecendo o ocorrido e quais foram as ações corretivas e preventivas. Esta notificação pode ser feita por meio de relatório conforme rotina do CEP.

6. ANEXOS

Não aplicável.

7. FORMULÁRIOS UTILIZADOS

Não aplicável.

8. REFERÊNCIAS

BRASIL, Resolução N° 466 de 12 de dezembro de 2012, Publicada no DOU nº 12 – quinta-feira, 13 de junho de 2013 – Seção 1.

Manual Tripartite Harmonizado para a Boa Prática Clínica (GCP). Conferência Internacional de Harmonização (ICH), 1996

Boas Práticas Clínicas: Documento das Américas. Grupo de Trabalho em Boas Práticas Clínicas (GT/BPC), 2005.

9. DISTRIBUIÇÃO

ÁREA	No. DE CÓPIAS
Enfermaria de Pesquisa Clínica da FMT-HVD (PesClin)	01

10. HISTÓRICO DE REVISÕES

No. DA REVISÃO	DATA	ITEM ALTERADO	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO	RESP. PELA ALTERAÇÃO	JUSTIFICATIVA

11. DESATIVAÇÃO

DATA	RESPONSÁVEL	MOTIVO DA DESATIVAÇÃO

8.4.3 POP 3. Procedimentos para coleta de escarro do estudo

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO Protocolo: Protocolo: Biomarcadores para exclusão do diagnóstico de tuberculose ativa: um coorte prospectivo (Immiprint®)	
Título: Procedimentos para coleta de escarro do estudo		POP.CLIN.003
Emissão: 23 / 05 / 2018	Revisão: ____ / ____ / ____	Nº 001

1. OBJETIVO

Estabelecer os procedimentos para coleta de escarro dos participantes do estudo IMMIPRINT no Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se aos profissionais que darão assistência e instruções aos participantes na coleta de amostras de escarro que serão armazenadas no biorrepositório do estudo, conforme delegação do investigador principal.

3. DEFINIÇÃO/SIGLAS

CRF	Formulário de Relato de Caso
TB	Tuberculose
TBMR	Tuberculose multirresistente
Biorrepositório	Coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais.

4. RESPONSABILIDADES

A responsabilidade pela implantação e treinamento dos membros da equipe para a aplicação deste POP caberá ao pesquisador responsável pelo protocolo na FMT-HVD ou a alguém da equipe do estudo por ele designado.

A responsabilidade pelas atividades descritas neste POP é do pesquisador responsável do estudo e serão executadas pelos membros da equipe do estudo delegados para a realização das mesmas.

5. FLUXOGRAMAS

Não se aplica

6. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

6.1. Materiais Necessários

- ✓ Etiquetas de identificação
- ✓ Água potável ou estéril
- ✓ Copos descartáveis e limpos
- ✓ Recipientes de boca larga estéreis para coleta da amostra
- ✓ Luvas descartáveis
- ✓ Máscara/Respirador
- ✓ Caixa térmica e gelox
- ✓ Sacos plásticos transparentes
- ✓ Algodão
- ✓ Instruções aos participantes para a coleta domiciliar
- ✓ Formulário de Rastreamento de Amostra
- ✓ Checklist de visita (se necessário)
- ✓ Formulário de Rastreamento de Amostras de Escarro

6.2. Volume aceitável:

- O volume-alvo na coleta é de pelo menos 3mL (ideal 5mL) de escarro.
- Caso não atinja o volume necessário na primeira coleta, deve-se realizar o pool de amostras.
- Caso, mesmo após o pool, não atinja o volume necessário através do escarro espontâneo, a indução do escarro é recomendada.

6.3 Tipos de coleta:

6.3.1. Escarro espontâneo:

- A coleta deve, sempre que possível, ser feita pela manhã, por causa do acúmulo de secreções durante a noite e podendo ser realizada na clínica ou em casa (logo após a higiene bucal);
- A amostra deve ser coletada em local bem ventilado ou em local específico para a coleta de escarro. A equipe clínica ao coletar o escarro, independentemente do local, deve seguir as recomendações de controle de infecção apropriadas, utilizando os EPI/ EPC adequados (máscara N95, luvas descartáveis, jaleco, avental e gorro descartáveis e óculos de proteção);
- Deve-se manter uma distância do participante, desde que permita visualizá-lo durante o procedimento para que seja possível orientá-lo, caso necessário, e para garantir que esteja isolado de outras pessoas até o fim da coleta;
- O técnico do laboratório ou outra pessoa do estudo delegada para orientar o paciente neste procedimento, deve fornecer um pote descartável e papel toalha. Além disso, deve orientar que tussa profundamente, repetidas vezes, e que escarre

dentro do pote. O paciente é orientado a retornar ao centro de pesquisa no dia seguinte trazendo a 2ª amostra de escarro, que poderá ser colhida em casa, seguindo as normas da cartilha para coleta em domicílio, visto no anexo 1 deste documento.

6.3.1.1. Pool de escarro:

- O pool deverá ser feito quando não for atingido o volume de 3 mL na primeira coleta;
- O procedimento para a realização do pool se dá da seguinte forma:
 - Caso o paciente não consiga coletar a quantidade necessária, deverá comparecer na unidade no dia seguinte para uma outra coleta ou trazer a amostra de casa;
 - Caso realize a coleta em casa, orienta-se que a amostra deverá ser mantida em refrigeração até sair de casa e, se possível, acondicionada em uma frasqueira com gelox durante o transporte até o centro de pesquisa. Não poderá permanecer sem refrigeração dentro de um período maior do que 3 horas após a coleta.
 - A coordenadora e/ou enfermeira deverá enviar as duas amostras para o Laboratório de Tuberculose, e o pool das mesmas será realizado apenas no laboratório.
 - Quando mesmo após o pool o volume de 3mL não for atingido, a indução do escarro é recomendada.

6.3.1.2. Procedimentos para coleta de escarro espontâneo

1. Coletar amostras de escarro em um recipiente descartável, de boca larga, à prova de vazamentos ou tubo de 50mL.
2. Antes da coleta, rotular o recipiente da amostra com o rótulo de identificação adequada fornecido pelo estudo.
3. Informar ao participante que a saliva e secreções nasais/ respiratórias superiores não são escarro e não são amostras aceitáveis.
4. Demonstrar ao participante como lavar corretamente sua boca e como coletar uma amostra de escarro usando um copo de água e ou recipiente/tubo.
5. Instruir o participante a:
 - Limpar bem suas mãos com água e sabão. Fornecer aos participantes toalhas de papel descartáveis limpas para secagem das mãos;
 - Lavar a boca com água potável antes da coleta de escarro. Fornecer um copo descartável limpo, para cada participante;
 - Respirar profundamente algumas vezes e, em seguida, tossir bem profundo;
 - Inclinar-se para frente, inspirar e expirar lentamente duas vezes, prender a respiração por 2-3 segundos de cada vez, e na terceira vez com força tossir para promover a secreção do escarro;
 - Coletar o escarro dentro do recipiente estéril fornecido e evitar encostar no interior ou na borda do recipiente de amostras ou na tampa com os dedos;

- Uma vez concluída a coleta, limpar bem as suas mãos com água e sabão. Fornecer aos participantes toalhas de papel descartáveis limpas para secagem das mãos;
6. Repetir a sequência acima até que uma quantidade adequada de escarro seja coletada. Isso pode levar até 1 hora. Se o participante for incapaz de produzir escarro suficiente dentro desse período, decidir se o participante é "incapaz de expectorar", ou se deve reagendar a coleta de escarro, ou se a indução de escarro é indicada.
 7. Fechar bem a tampa do recipiente para evitar qualquer vazamento.
 8. Estimar o volume de escarro através das marcações do recipiente. Um volume mínimo de 3 ml de escarro deverá ser obtido, porém o volume ideal é de 3-5mL.
 9. Após a amostra ser coletada, envolver o recipiente em algodão (o suficiente para absorver todo o conteúdo em caso de vazamento), e colocar o recipiente envolto com algodão dentro de um saco plástico transparente de forma que o conjunto se mantenha à prova de vazamentos. Manter a amostra em caixa térmica refrigerada, a menos que seja entregue ao Laboratório de Tuberculose.
 10. Preencher o Formulário de Rastreamento de Amostras de Escarro referente ao Envio e entregar as amostras ao Laboratório o quanto antes.
 11. Solicitar o preenchimento do Formulário de Rastreamento das Amostras de Escarro pelo Laboratório atestando o recebimento.

6.3.1.3. Procedimentos específicos para coleta de escarro espontâneo em casa e recebimento no centro de pesquisa

Os participantes serão instruídos pela equipe de estudo sobre como obter escarro, com atenção aos detalhes a respeito da primeira coleta da manhã, armazenamento da amostra em local refrigerado, e trazendo a amostra para a clínica o mais breve possível. Os detalhes dos procedimentos a seguir devem ser seguidos:

1. Fornecer ao participante um recipiente de amostra devidamente identificado (com as etiquetas do estudo), algodão e um saco plástico transparente para armazenamento e transporte até o centro.
2. Marcar no recipiente "CASA" para indicar que a amostra foi coletada em casa.
3. Informar ao participante que saliva e secreções nasais/respiratórias superiores não são escarro e portanto não serão aceitas.
4. Instruir o participante a:
 - a. Coletar o escarro depois de levantar, antes do café da manhã, e antes de tomar qualquer medicação.
 - b. Limpar bem as mãos com água e sabão.
 - c. Lavar a boca com água potável antes da coleta de escarro. Fornecer um copo descartável limpo para cada participante.
 - d. Respirar profundamente algumas vezes e, em seguida, tossir bem profundo.

- e. Inclinarse para frente, inspirar e expirar lentamente duas vezes, prender a respiração por 2-3 segundos de cada vez, e na terceira vez com força tossir para promover a secreção do escarro.
 - f. Coletar o escarro dentro do recipiente estéril e evitar encostar no interior ou na borda/tampa do recipiente da amostra com os dedos.
 - g. Envolver o recipiente em material absorvente (algodão), e colocar em um saco plástico a prova de vazamento (saco transparente)
 - h. Uma vez concluída a coleta, limpar bem as mãos com água e sabão.
 - i. Guarde o recipiente na geladeira ou caixa térmica com gelox.
 - j. Traga o recipiente com a amostra para a clínica o mais breve possível.
5. Se a refrigeração não for possível, aconselhar o participante a retornar a amostra ao centro de pesquisa dentro de até 3 horas após a coleta. A amostra recebida pela equipe do centro de pesquisa deverá ser encaminhada imediatamente a recepção do Laboratório de Tuberculose após o recebimento pela equipe do centro de pesquisa.
 6. Sugerir ao participante que coloque a garrafa de água potável e o recipiente de coleta da amostra em um lugar que o faça lembrar de coletar logo pela manhã ao se levantar.
 7. Informar ao participante que ele deverá fornecer a data e hora da coleta quando ele trouxer a amostra para o centro de pesquisa. Essas informações devem ser registradas posteriormente em formulário específico.

Após o recebimento da amostra na recepção do Laboratório da Tuberculose, perguntar ao participante quando (data e horário) foi coletada a amostra e registrar no checklist/prontuário do paciente e CRF específica. Os passos abaixo devem também ser seguidos:

1. Estimar o volume de escarro por comparação com as marcações no próprio recipiente. Se o volume da amostra for menor que 3mL, tentar coletar outra amostra do participante, enquanto o mesmo estiver no centro de pesquisa.
2. Refrigerar a amostra até que seja transportada para o laboratório, caso venha a ser transportada em um período superior a 3 horas após a coleta.
3. Preencher o protocolo de custódia da amostra e a CRF de rastreamento da amostra.

6.3.2. Escarro induzido

A coleta de 3 a 5mL de escarro espontâneo em uma única amostra é sempre preferível, no entanto, para crianças menores de 5 anos de idade, ou outras pessoas que tenham dificuldade em expectorar, a indução de escarro ou aspirado/lavagem gástrico são aceitos. Se a indução de escarro for necessária, deve-se fornecer ao participante instruções apropriadas.

- Esta forma de coleta é recomendada quando o paciente tem pouca secreção ou não consegue coletar normalmente o escarro.

- A coleta por indução é feita após realização de nebulização com solução salina (5 ml de solução de cloreto de sódio de 5 a 10%) em água produzida por um nebulizador. Esse procedimento deve ser acompanhado por profissional treinado e em Unidade de Saúde equipada com sala especial e cuidados de biossegurança para prevenir a contaminação do ambiente pelos aerossóis formados.
- A amostra deve ser marcada como "INDUZIDA", e ter uma consistência aquosa e que pode ser confundida com saliva.

6.3.3. Lavado gástrico

Recomendado quando o paciente é incapaz de produzir escarro espontâneo. Deve ser realizado no início da manhã em jejum e pelo menos 8 a 10 horas após o participante ter comido ou tomado drogas por via oral. Recomendam-se duas a três amostras consecutivas no início da manhã. As amostras devem ser colocadas em gelo e imediatamente transportada para o laboratório para o processamento. Uma amostra de 3 a 10 ml é necessária por tentativa e deve ser neutralizada em 100 mg de bicarbonato de sódio quando há atraso de mais de 4 horas.

7. ANEXOS

Não se aplica

8. FORMULÁRIOS UTILIZADOS

Não se aplica

9. REFERÊNCIAS

Jones; Fátima D. Manual de Laboratório RePORT. Versão 01/2015. Pesquisa Regional Prospectiva e Observacional em Tuberculose no Brasil (RePORT-Brasil).

Manual de Orientações Técnicas para: Coleta, Identificação, Acondicionamento, Preparo e Transporte de Amostras Biológicas. <http://www.lacen.pa.gov.br/?q=node/256>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Guia de orientações para coleta de escarro. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

10. DISTRIBUIÇÃO

ÁREA	No. DE CÓPIAS
Enfermaria de Pesquisa Clínica da FMT-HVD (PesClin)	01

11. HISTÓRICO DE REVISÕES

No. DA REVISÃO	DATA	ITEM ALTERADO	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO	RESP. PELA ALTERAÇÃO	JUSTIFICATIVA

12. DESATIVAÇÃO

DATA	RESPONSÁVEL	MOTIVO DA DESATIVAÇÃO

8.4.4 POP 4. Processamento de amostra pelo fluxo B

 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP-GTB-007
PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PELO FLUXO B		REVISÃO: 02
Elaborado: Jaquelane Silva	Revisado: Vitória Printes	Aprovado: Jaquelane Silva
Data: 24/05/2017	Data: 30/07/2019	Data: 10/03/2019
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 

1. OBJETIVO

Padronizar o processamento de amostras biológicas provenientes de sítios estéreis e não estéreis pelo fluxo B.

2. ALCANCE

Bioquímicos, técnicos e estagiários do laboratório de Tuberculose da FMT-HVD envolvidos na atividade.

3. DEFINIÇÃO DE SIGLAS

CSB – Cabine de Segurança Biológica

LJ – Lowenstein-Jensen

LBA – Lavado Broncoalveolar

MiniBAL – Mini Lavado Broncoalveolar

MGIT – Equipamento BACTEC MGIT BD

Nalc-NaOH – N-acetil-L-cisteína-Hidróxido de sódio

POP – Procedimento Operacional Padrão

4. RESPONSABILIDADES

A responsabilidade pela realização da técnica e registros dos resultados é dos colaboradores executores do procedimento, treinados, capacitados e autorizados pela gerência de Tuberculose.

O responsável técnico responde pelos procedimentos escolhidos, pela validação dos mesmos e assegura a competência técnica dos executores.

Os documentos devem permanecer arquivados, sendo proibida a reprodução total ou parcial deste sem autorização da chefia do laboratório.

5. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

CÓPIA CONTROLADA. REPRODUÇÃO PROIBIDA

PÁGINA 1 DE 12

		PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	POP-GTB-007
PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PELO FLUXO B		REVISÃO: 02	
Elaborado: Jaquelane Silva	Revisado: Vitória Printes	Aprovado: Jaquelane Silva	
Data: 24/05/2017	Data: 30/07/2019	Data: 10/03/2019	
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 	

5.1. Fundamento do Método

Para que seja possível realizar o isolamento de micobactérias a partir da sementeira de espécimes biológicos em meios de cultura específicos é necessário identificar qual sítio anatômico o material foi colhido.

Materiais biológicos que apresentam microbiota bacteriana associada precisam ser tratados com agentes químicos para eliminação dos microrganismos, já que se desenvolvem mais rápido que as micobactérias, podendo impedir o seu crescimento. O Nalc é um potente agente mucolítico, reduzindo a viscosidade do material enquanto o hidróxido de sódio oferece também uma ação descontaminante. Espécimes colhidos de cavidades fechadas não necessitam ser descontaminados, desde que tenham sido colhidos assepticamente e colocados em recipiente estéril.

5.2. Materiais e equipamentos

5.2.1 Materiais:

Tabela 1: Materiais necessários para o processamento de UMA amostra

Material	Quantidade	Finalidade
Álcool 70%	1	Limpar os tubos e para desengordurar as lâminas
Envelope grau (pequeno)	1	Descartar do material contaminado
Estante para tubo cônico	3	Apoiar os tubos
Gaze pequena 7,5 x 7,5	10	Limpar lâminas, tubos, etc.
Hipoclorito 4%	1	Promover a desinfecção em caso de derramamento
Lâmina de vidro borda fosca	1	Confeccionar o esfregaço para baciloscopia
Lápis	1	Registrar nº do BAAR na lâmina
Papel absorvente	6	Forrar o campo de trabalho no interior da CBS
Pipeta pasteur de 3 mL	1	Transferir a amostra

 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP-GTB-007
PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PELO FLUXO B		REVISÃO: 02
Elaborado: Jaqueline Silva	Revisado: Vitória Printes	Aprovado: Jaqueline Silva
Data: 24/05/2017	Data: 30/07/2019	Data: 10/03/2019
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 

Pipeta sorológica de 2mL	3	Transferir a amostra, reagente
Tubo cônico de 50mL ou frasco de vidro de boca larga.	1	Desprezar sobrenadante. Pode ser reaproveitado o tubo usado anteriormente para armazenar tampão.
Tubo cônico <u>estéril</u> de 50mL	1	Tubo de reação (amostra+ag. químico)
Tubo estéril de 2 mL	1	Guardar do sedimento
Vasilha plástica	2	Organizar material limpo e sujo

5.2.2 Reagentes:

Tabela 1: Reagentes necessários para o processamento de UMA amostra

Reagentes	Quantidade	Finalidade
BBL	1	Semeadura em meio líquido
LJ	1	Semeadura em meio sólido
Solução depurante	1	Tratar quimicamente a amostra
Nalc em pó (alíquota previamente pesada)	1	Para adicionar ao tubo de reação a fim de aumentar o poder de liquefação.
Suplemento (Panta+OADC)	1	Enriquecer o BBL
Tampão pH 6.8	1	Neutralizar da reação

5.2.3 Equipamentos:

- Agitador tipo Vortex
- CBS
- Estufa bacteriológica (36°C ±1°C)

CÓPIA CONTROLADA. REPRODUÇÃO PROIBIDA

PÁGINA 3 DE 12

 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP-GTB-007
PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PELO FLUXO B		REVISÃO: 02
Elaborado: Jaquelane Silva	Revisado: Vitória Printes	Aprovado: Jaquelane Silva
Data: 24/05/2017	Data: 30/07/2019	Data: 10/03/2019
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 

- Pipetador automático
- Refrigerador (2°C a 8°C)
- Cronômetro

5.3. Tipos de Amostras

Qualquer material biológico. Exceto fezes. Para maiores detalhes verificar POP-GTB-001.

5.4. Volume Mínimo de Amostra

Depende do tipo de espécime clínico. Verificar POP-GTB-001.

5.5. Estabilidade

Dos reagentes após aberto:

- A solução depurante deve ser usada por até 24h após adição do Nalc (no caso da solução preparada *in house*), ou após a abertura do frasco (no caso do Mycoprep). Desprezará-la após esse período.
- O suplemento (Panta+OADC) é estável por até 3 dias (72 horas) após reconstituição, se conservados de 2 a 8°C. Desprezará-lo após esse período ou a qualquer momento em caso de turbidez.
- Meios de cultura, tampões e cartucho do gene verificar validade na embalagem do produto.

5.6. Armazenamento das Amostras

As amostras devem ser mantidas em temperatura de 2°C a 8°C até o momento do processamento. O tempo de armazenamento da amostra é relativo ao tipo de material POP-GTB-001.

5.7. Critérios de Rejeição de Amostras

- ✓ Amostra identificada de maneira errada;
- ✓ Amostra não identificada;
- ✓ Amostra sem requisição;

 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP-GTB-007
PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PELO FLUXO B		REVISÃO: 02
Elaborado: Jaquelane Silva	Revisado: Vitória Printes	Aprovado: Jaquelane Silva
Data: 24/05/2017	Data: 30/07/2019	Data: 10/03/2019
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 

- ✓ Amostra em recipiente inadequado;
- ✓ Amostra com volume transbordado ou vazado;
- ✓ Amostra com aspecto inadequado (restos alimentares, liquefeita);
- ✓ Amostra com volume insuficiente.

5.8. Ação em Caso de Acidente

A conduta a ser adotada dependerá do tipo de ocorrência. Se houver contato dos olhos ou pele com algum dos reagentes, lavar o local com água abundante (em temperatura ambiente) por no mínimo 15 minutos. Caso haja derramamento de material biológico na área de trabalho, coloque hipoclorito de sódio a 4% sobre o líquido derramado, cubra com papel toalha e ligue a lâmpada UV por 30 min. Evacue a área. Passado esse tempo, retorne ao ambiente limpando a área como habitual e libere a área de trabalho. Comunicar imediatamente o supervisor ou chefia do laboratório.

5.9. Biossegurança

É obrigatório o uso de EPI (máscara N95, luvas, avental, gorro). Este procedimento deve ser realizado em uma CSB, classe II B2 em laboratório nível 2.

Os reagentes são tóxicos e, portanto não devem ser ingeridos ou entrar em contato com a mucosa.

5.10. Procedimentos gerais

Os procedimentos para realização dos exames podem ser divididos em 3 etapas: Pré-analítica; Distribuição dos reagentes (etapa limpa) e Manipulação das amostras (etapa suja).

5.10.1. Etapa Pré-analítica

Antes de iniciar o procedimento, ler atentamente POP-GTB-002 para conhecimento de cuidados pré-analíticos e orientação organizacional do trabalho.

5.10.2. Distribuição dos reagentes (etapa limpa)

CÓPIA CONTROLADA. REPRODUÇÃO PROIBIDA

PÁGINA 5 DE 12

		PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	POP-GTB-007
PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PELO FLUXO B		REVISÃO: 02	
Elaborado: Jaquelane Silva	Revisado: Vitória Printes	Aprovado: Jaquelane Silva	
Data: 24/05/2017	Data: 30/07/2019	Data: 10/03/2019	
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 	

Levar para cabine os reagentes necessários para realização dos exames (Solução depurante, Suplemento, Tampão do gene, Meios de cultura)

Preparo dos reagentes:

- Mycoprep – Frouxar um pouco a rosca da tampa do frasco (Não abrir). Apertar firmemente a ampola dentro do frasco contra os dedos até rompê-la. Apertar novamente a tampa e homogeneizar suavemente a solução, vertendo 2 a 3 vezes delicadamente (Não agitar-crítico).

- Solução depurante preparada *in house* – Completar o volume de uma das soluções (Citrato 2,9% ou NaOH 4%) preparadas previamente (Ver POP-GTB-026). O volume final deverá ser de 50mL (1:1). Homogeneizar. Adicionar a massa (0,25g) de Nalc e homogeneizar suavemente por inversão (Não agitar-crítico). ATENÇÃO: Só utilizar a solução depurante após solubilização do Nalc (Verificada pela ausência de partículas visíveis do pó na solução).
- Suplemento (Panta+OADC) – Verter todo o conteúdo de OADC no frasco do Panta. Homogeneizar suavemente a solução, aguardar até ficar límpida. Adicionar asepticamente 800uL dessa mistura a cada tubo de BBL a ser utilizado. Datar e registrar a hora da reconstituição no frasco. ATENÇÃO: Caso a reconstituição seja realizada ao término da semana, fazer alíquotas de 900mL para criotubos e congelar a -20°C para posterior utilização. Esse procedimento deverá ser realizado antes de iniciar o processamento de amostras (etapa limpa) preferencialmente em cabine utilizada para material limpo.

5.10.3 Manipulação das amostras (etapa suja)

Levar as amostras para CSB;

Processar material segundo ordem numérica pré-estabelecida (ver critérios no POP-GTB-002);

5.10.3.1. Pré-tratamento de amostras ESTÉREIS

- Espécimes líquidos com volume superior a 3mL (p.ex.; LCR, líquidos cavitários, secreções de cavidades fechadas) deverão ser centrifugados previamente para concentração do material.

 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP-GTB-007
PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PELO FLUXO B		REVISÃO: 02
Elaborado: Jaquelane Silva	Revisado: Vitória Printes	Aprovado: Jaquelane Silva
Data: 24/05/2017	Data: 30/07/2019	Data: 10/03/2019
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 

Após centrifugação deve-se desprezar sobrenadante e deixar 2 mL para realização dos exames. Homogeneizar em vortex por 5 segundos e proceder à inoculação nos meios de cultura e demais exames, conforme orientação a seguir (Ver tópico 5.10.3.4).

5.10.3.2. Pré-tratamento de amostras NÃO ESTÉREIS

- Espécimes líquidos com volume superior a 10mL (p.ex.; Urina, lavado gástrico, LBA, MiniBAL) deverão ser centrifugados previamente para concentração do material. Após centrifugação deve-se desprezar parte do sobrenadante (Pode-se deixar até 10mL de material concentrado) e homogeneizar em vortex por 5 segundos. Proceder à etapa de tratamento da amostra.

5.10.3.3. Tratamento das amostras NÃO ESTÉREIS – Descontaminação e fluidificação

- Amostras de escarro, secreção/biópsia de cavidade aberta não requerem pré-tratamento. Amostras de biópsias deverão ser maceradas com ajuda de pistilo e grau. Usar lâmina de bisturi somente em casos de biópsia de pele, cuja consistência endurecida requeira a utilização desse instrumento. Utilizar água estéril (Volume de água a ser utilizado pode ser de até 10mL) para ressuspender a amostra macerada.
- Transferir no mínimo 2mL (e no máximo 10mL) da amostra para um tubo cônico estéril de 50mL e homogeneizar em vortex por 5 segundos.
- Adicionar ao material a solução de depurante, volume a volume (proporção 1:1) com o auxílio de uma pipeta sorológica, descartando-a. P. ex.: Se foi transferido 3mL de amostra para o tubo cônico, adicionar 3mL da solução depurante. Utilizar uma nova pipeta para cada amostra.

- d) Iniciar a contagem do tempo quando a solução depurante for adicionada a primeira amostra da sequência, marcando 15 minutos no cronômetro.
- e) Fechar a tampa do tubo e agitar a suspensão em vortex (5 segundos). Homogeneizar por inversão a cada 5 minutos, em média, ao longo do tempo de 15 minutos da reação. Se após 10 minutos a amostra ainda estiver mucoide, adicionar aproximadamente 50mg de Nalc em pó e homogeneizar em vortex (5 segundos).

CÓPIA CONTROLADA. REPRODUÇÃO PROIBIDA

PÁGINA 7 DE 12

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP-GTB-007
	PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PELO FLUXO B		REVISÃO: 02
Elaborado: Jaquelane Silva	Revisado: Vitória Printes	Aprovado: Jaquelane Silva	
Data: 24/05/2017	Data: 30/07/2019	Data: 10/03/2019	
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 	

Não exceder o tempo de 15 minutos da reação!

- f) Repetir as etapas b e c com as amostras subseqüentes, dando um intervalo de 35 segundos entre uma amostra e outra.
- g) Quando terminar o tempo, adicionar tampão fosfato pH 6.8 até completar o volume de 50mL do tubo cônico.
- h) Aguardar 35 segundos e adicionar o tampão na próxima amostra da sequência de trabalho. Continue a adicionar o tampão respeitando esse intervalo de 35 segundos entre uma amostra e outra, de modo que no final todas as amostras não terão sido expostas por mais de 20 minutos ao Nalc. Um tempo de exposição maior ao agente químico é crítico para as micobactérias.

- i) Centrifugar os tubos por 15 minutos a 3000g (ou o equivalente em rpm) de 4 a 12°C. Ao término da centrifugação, retirar os tubos do equipamento, colocá-los em estante e voltar para CSB.
- j) Localizar o sedimento e verter cuidadosamente e de uma só vez o sobrenadante para outro tubo cônico vazio (pode ser um tubo usado anteriormente apenas para armazenar tampão) ou frasco de vidro de boca larga. ATENÇÃO: Após este processo, caso fique um volume remanescente, retirar o excesso com o auxílio de uma pipeta.
- k) Ressuspender o sedimento com 2mL de tampão fosfato pH 6.8. NOTA: Caso não seja necessário realizar cultura líquida (MGIT), o sedimento poderá ser ressuspenso em água estéril e inoculado em meio sólido, bem como realizado os demais exames.
- l) Homogeneizar a suspensão em vortex (10 segundos).

5.10.3.4. Realização dos exames

- a) Com o auxílio de uma pipeta sorológica de 2mL, retirar todo o sedimento reconstituído do tubo cônico e inocular 500uL em BBL, 200uL em LJ, 1 gota no ágar sangue. Após semeadura, acondicionar os tubos de meios de cultura inclinados em uma bandeja de polipropileno, de maneira que o lado da tampa do tubo fique ligeiramente mais alto e com a superfície do meio voltada para

 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP-GTB-007
PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PELO FLUXO B		REVISÃO: 02
Elaborado: Jaqueline Silva	Revisado: Vitória Printes	Aprovado: Jaqueline Silva
Data: 24/05/2017	Data: 30/07/2019	Data: 10/03/2019
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 

cima. Incubar a 36°C ±1°C, colocando-os na bandeja de secagem e mantendo-os com a tampa frouxa até a primeira leitura para que o inóculo seque. Fechar então os tubos.

- b) Para realização do gene, adicione 700uL do sedimento reconstituído em tubo cônico de 15mL contendo 1400uL do reagente de amostra (Tampão do gene). A razão do tampão para a amostra é de 2:1. No caso do LCR, se o volume de amostra recebido for de 100uL a 1mL, priorizar a realização de gene e se possível a cultura em meio líquido. Neste caso, para o preparo do mix da reação do gene apenas complete o volume de amostra disponível com até 2mL do tampão do gene.
- c) Aliquotar parte do volume restante da pipeta em criotubo ou "eppendorf" estéril e armazenar a -20°C para reutilização caso necessário, a outra parte (50uL) utilizar para confecção do esfregaço.
- d) No caso de amostras estéreis seguir as orientações nos passos anteriores no que diz respeito ao volume a ser adicionado em cada meio, incubação, realização de demais exames e criopreservação do sedimento. Amostras de biópsias deverão ser maceradas com ajuda de pistilo e grau. Utilizar 2 ml de água estéril para ressuspender a amostra macerada. Transferir a suspensão para um tubo cônico e homogeneizar em vortex por 5 segundos e proceder conforme orientação acima.
- e) **ATENÇÃO:** Antes de iniciar a realização dos exames, recomenda-se consultar as orientações descritas detalhadamente nos POPs dos respectivos exames:
- Confecção de lâmina e coloração de ZN - POP-GTB-004.
 - GeneXpert MTB/RIF - POP-GTB-005.

5.11. Controle de Qualidade:

5.11.1 Controle de qualidade interno

O controle do processamento de amostras no fluxo B está descrito no POP-GTB-023.

5.11.2 Controle de qualidade externo

Os ensaios de identificação de cepas de micobactérias estão contemplados pelo programa internacional de controle externo da qualidade do "College of American Pathology" (CAP), com realização semestral de ensaio de proficiência para essa atividade.

CÓPIA CONTROLADA. REPRODUÇÃO PROIBIDA

PÁGINA 9 DE 12

		PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	POP-GTB-007
PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PELO FLUXO B		REVISÃO: 02	
Elaborado: Jaquelane Silva	Revisado: Vitória Printes	Aprovado: Jaquelane Silva	
Data: 24/05/2017	Data: 30/07/2019	Data: 10/03/2019	
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 	

6. FORMULÁRIOS

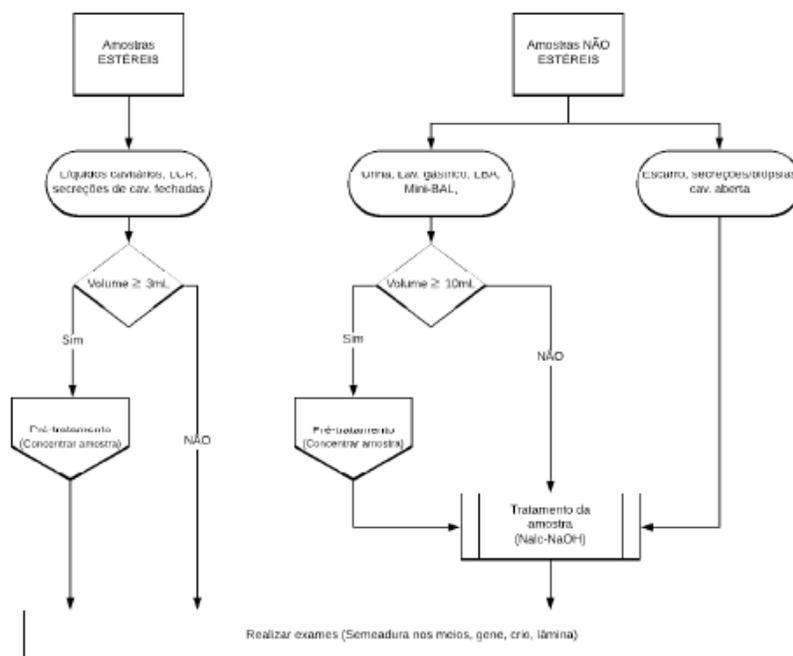
Formulário de Controle de Processamento de Amostras (FLAB-006).

Formulário de Controle da Produção de Solução Depurante Nalc-NaOH (FLAB-051).

Formulário de Retratamento de amostras do fluxo B (FLABxx)

7. ANEXOS

Figura 1: Processamento de amostras provenientes de sítios estéreis e não estéreis pelo Fluxo B



 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP-GTB-007
PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PELO FLUXO B		REVISÃO: 02
Elaborado: Jaqueline Silva	Revisado: Vitória Printes	Aprovado: Jaqueline Silva
Data: 24/05/2017	Data: 30/07/2019	Data: 10/03/2019
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 

8. REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. 1ª Edição – 2008. Brasília, DF 2008.
2. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo7: Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2013.
3. Mycobacteriology Laboratory Manual. First Edition, April 2014. Stop TB Partnership.
4. Lourenço, M.C. *et al.* Método NALC-NaOH. Protocolo: Pesquisa Regional Prospectiva e Observacional em Tuberculose no Brasil (RePORT-Brasil). Procedimento Operacional Padrão: POP BA 002. Rev. 02. Ano de emissão: 2015.
5. RePORT Lab Manual v02, fevereiro, 2017.

8.5 Anexo/Apêndice 5: Status de submissão na revista *International Journal of Infectious Disease*

IJID - International Journal of Infectious Disease emEditorial Manager

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • PRIVACY

Role: Author Username: marcelocordeiro.br@gmail.com

Submissions Being Processed for Author **Marcelo Cordeiro-Santos, MD, Ph.D.**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission Send E-mail	THEIJID-D-20-05237	Examination of respiratory specimens improves microbiological diagnosis of patients with presumptive extrapulmonary tuberculosis	18 Nov 2020	20 Nov 2020	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.