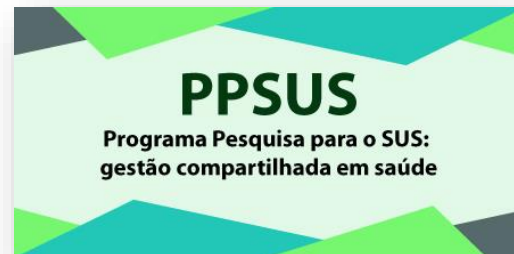




II WORKSHOP DA REDE SUL DE MICOBACTÉRIAS  
II MOSTRA ESTADUAL DA ATENÇÃO À SAÚDE PRISIONAL  
IV ENCONTRO REGIONAL DE TUBERCULOSE

22 E 23 DE OUTUBRO DE 2018  
UNISC - SANTA CRUZ DO SUL, RS



# NOVO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE: DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE RESISTÊNCIA

***Maria Lucia Rosa Rossetti***

Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CDCT  
Secretaria Estadual da Saúde SES/RS  
Hospital Sanatório Partenon (HSP)  
Universidade Luterana do Brasil - ULBRA  
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ  
Centro de Pesquisa em Tuberculose da UFRJ

## Contextualização do Problema

- ✓ **O diagnóstico da TB ainda é um problema**  
Baciloscopia (baixa sensibilidade) e Cultura (demorada)
- ✓ **3 milhões de casos não são diagnosticados**  
Perpetua a cadeia de transmissão
- ✓ **Introdução do GeneXpert (identificação de DNA)**  
Aumentou a detecção, porém gerou dependência tecnológica e poucos locais utilizam o teste (subsidiados).
- ✓ **O CDCT e a FIOCRUZ** possuem expertise no desenvolvimento de novos testes moleculares.

### Objetivo Geral

- **Desenvolver e avaliar um método de diagnóstico de tuberculose para detectar *M. tuberculosis* e resistência a isoniazida e a rifampicina através de identificação de DNA em amostras de pacientes suspeitos de tuberculose em uma plataforma Q3.**

**Kit Detect-TB IS6110**

**INH (katG inhA -15)  
RIF (rpoB)**



Mesmas amostras:  
Baciloscopia e/ou cultura  
Desfecho clínico

**Mesmas amostras de escarro**

**Ensaio TaqMan**



**Q3**



# Etapa 2 Avaliar Protocolo de Extração

## Resina de sílica

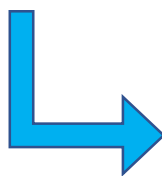
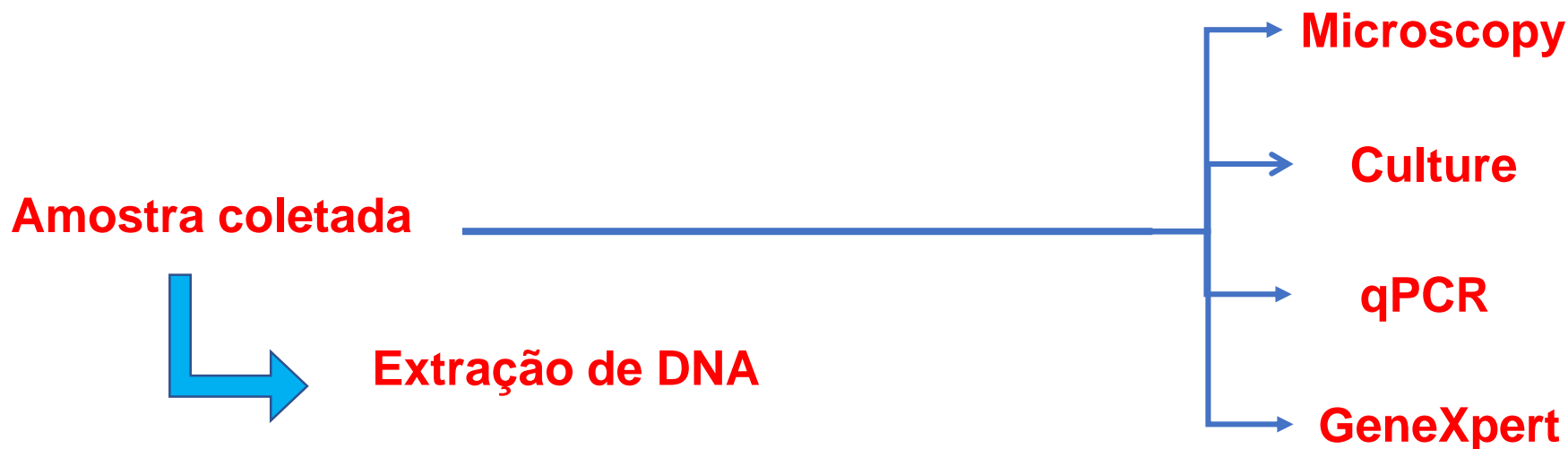


## Lise por sonicação



Cartão FTA

## Pacientes com suspeita de TB resistente Hospital Sanatório Partenon



Q3 Real Time PCR

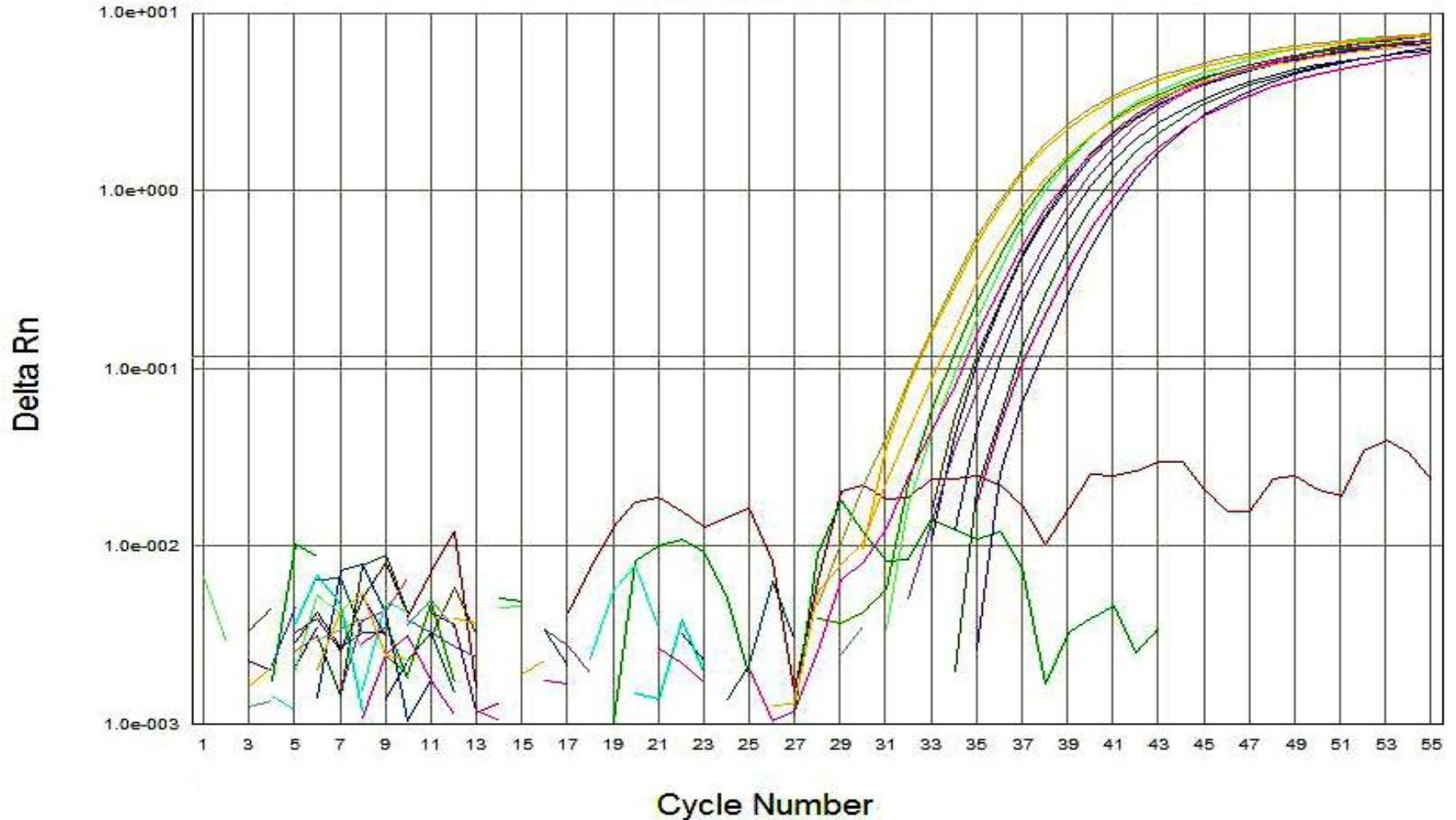


# Atividades planejadas

Atividade por trimestre	18/1	18/2	18/3	18/4	19/1	19/2	19/3	19/4
Padronização da extração de amostras biológicas	X							
Padronização de um teste de real time para detecção de M. tuberculosis no termociclador tradicional.		X						
Padronização do sistema incluindo as sondas para detecção da resistência			X	X				
Adequação do processo a tecnologia Q3				X				
Análises comparativas entre os sistemas utilizando amostras de DNA de cultura					X			
Implantação na rotina do Hospital para testes com amostras						X	X	
Avaliação da eficácia da utilização do método molecular de resistência na rotina							X	X
Apresentação dos resultados em congressos, artigos, relatórios outros...				X				X

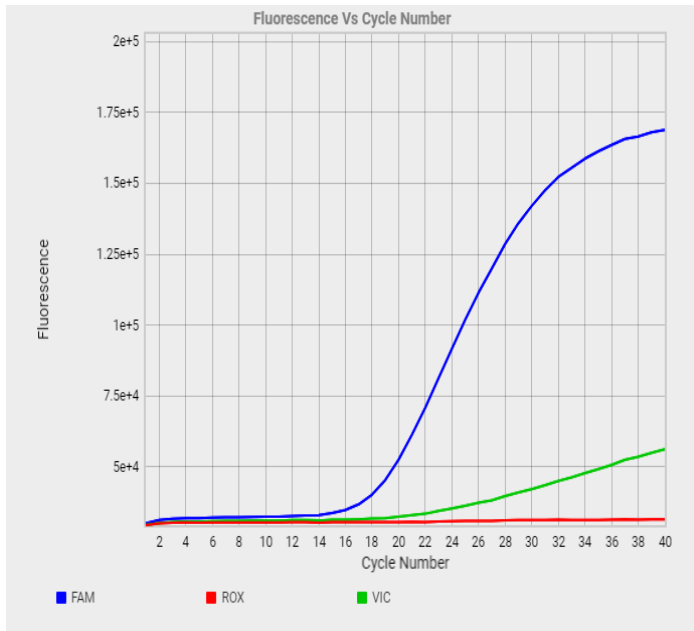
# Padronização Ensaio TaqMan-IS6110

Delta Rn vs Cycle

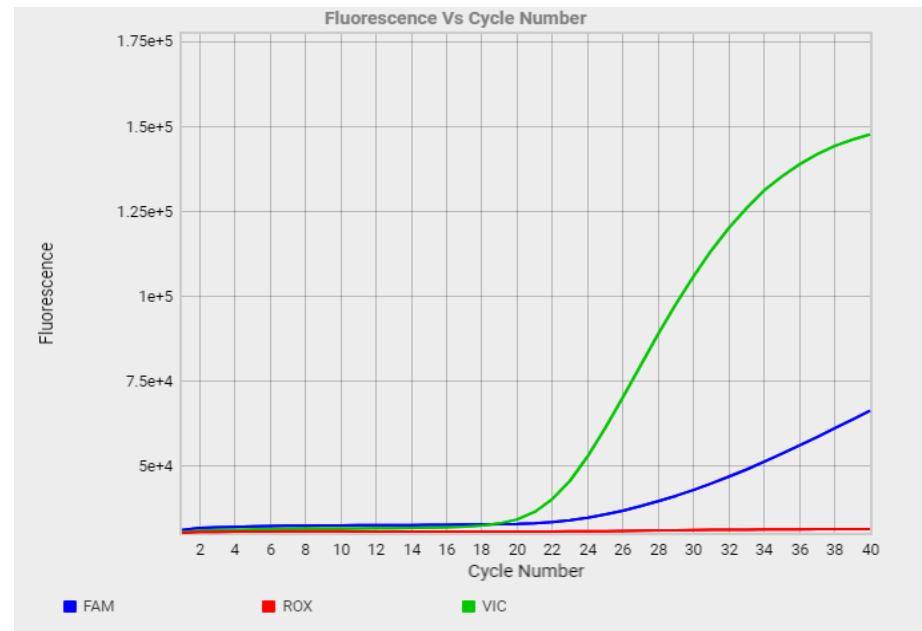




**Detecção de resistencia a INH(*katG* 315 G/C and *inhA* -15 C/T).**



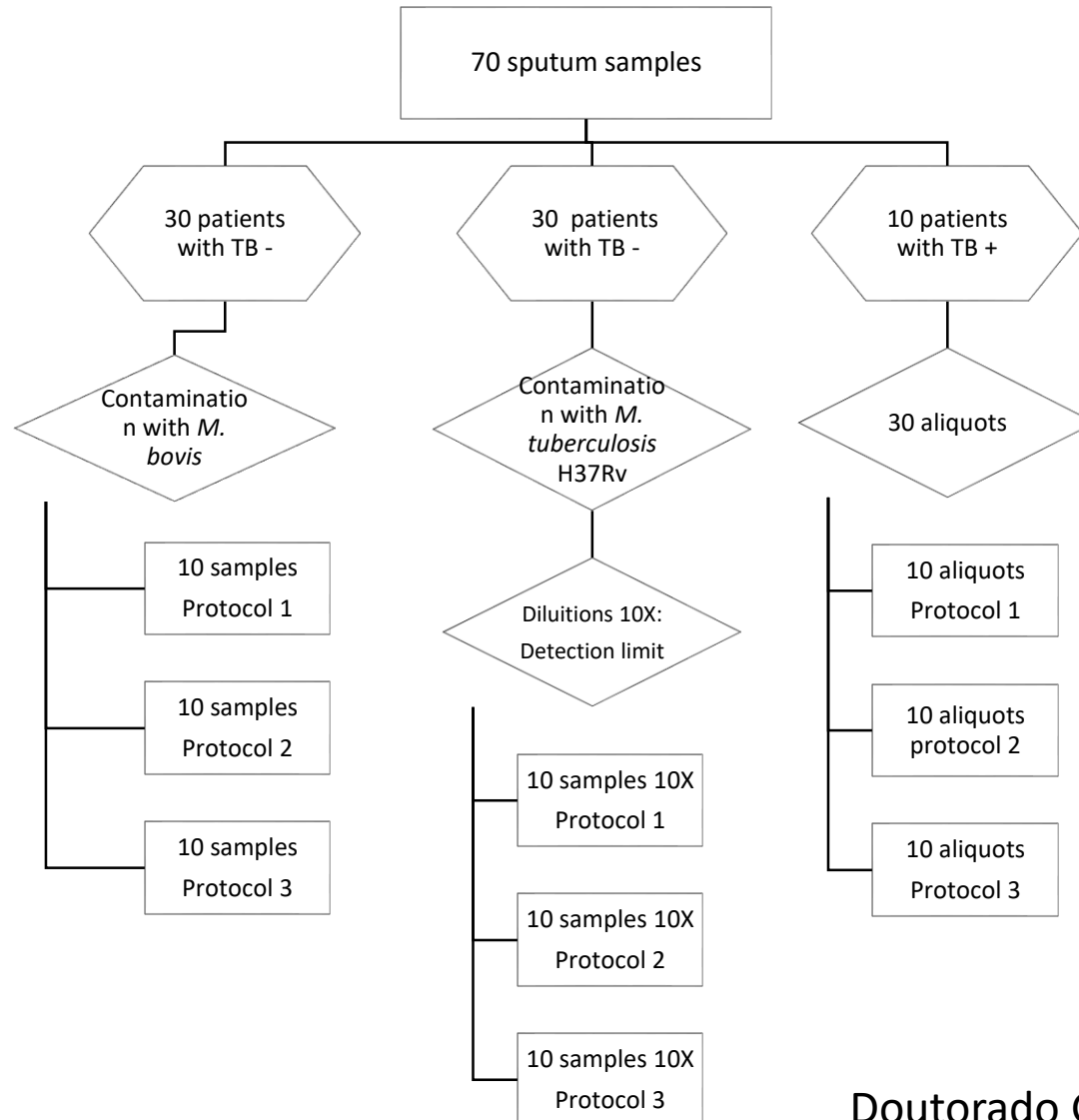
**Genótipo sensível**



**Genótipo resistente**

**55 amostras (*katG* e *INH A*)  
Sensibilidade de 94 e 97%  
Especificidade de 91 e 97%**

# Protocolo sílica (detect-TB) x sonicação x beads



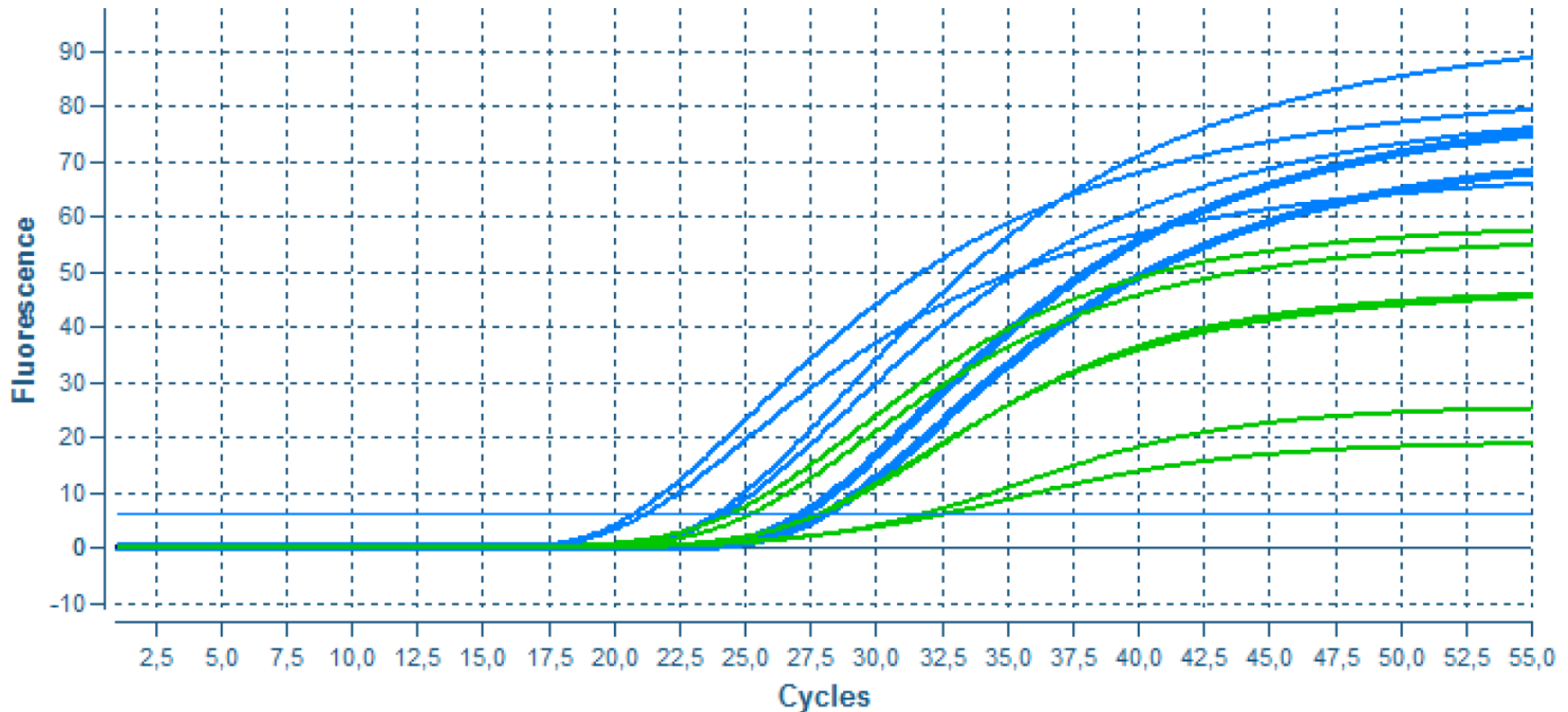
**CTs corresponding to the extraction protocols applied from DNA extracted from negative samples to TB contaminated with *M. bovis***

<b>Protocol 1 (silica resin)</b>	<b>Protocol 2 (magnetic beads)</b>	<b>Protocol 3 (sonication)</b>
26.48	-	27.25
26.21	-	27.16
24.87	31.64	27.10
-	33.23	27.27
31.49	32.52	27.21
25.27	-	27.23
27.58	33.54	27.25
30.56	-	27.28
-	30.91	24.40
29.42	33.72	27.14
<b>27.73 ± 2.48<sup>a</sup></b>	<b>32.59 ± 1.12<sup>b*</sup></b>	<b>26.92 ± 0.89<sup>a</sup></b>

real-time PCR detectou: **100% dos DNAs extraídos por sonicação**  
**80% por sílica**  
**60% por beads magnéticas.**

# Extração de DNA com FTA

## Q3-Plus versus ABI7500



Comparados entre termociclador padrão (ABI7500) e Q3.

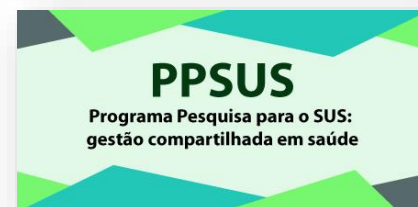
Concordância com o GeneXpert 94%

Cultura com a cultura 88%

# Recurso Aprovado

Tipo	Item	Detalhamento	Qtd.	Valor Solicitado	Valor Aprovado
Custeio	Material de Consumo	Componentes e/ou peças de reposição de equipamentos (filtros para a capela etc...)	5	R\$ 1.000,00	R\$ 5.000,00
Custeio	Material de Consumo	kits e tampões para extração de DNA	10	R\$ 900,00	R\$ 9.000,00
Custeio	Material de Consumo	Master mixes, primers, tampões, polímeros para sequenciamento convencional	30	R\$ 800,00	R\$ 24.000,00
Custeio	Material de Consumo	Reagentes/kit para microbiologia	10	R\$ 950,00	R\$ 9.500,00
Custeio	Material de Consumo	vidraria, plásticos	50	R\$ 50,00	R\$ 2.500,00

RUBRICA	VALOR (R\$)	%
Custeio	50.000,00	100%
Capital	0,00	0,0
Bolsa	0,00	0,0
<b>Total</b>	<b>50.000,00</b>	<b>100%</b>



# Como os resultados poderão ser incorporados pelo SUS?

**Contribuir para um diagnóstico de TB com menor custo-efetividade através dos seguintes resultados:**

- 1. Desenvolver insumos para diagnóstico molecular para produção no país;**
- 2. Protótipo de kit de diagnóstico de TB nacional na plataforma Q3 permitindo diagnóstico rápido;**
- 3. Estudo de avaliação da plataforma na rotina de diagnóstico de TB;**
- 4. Parceria consolidada entre pesquisadores do CDCT, do Hospital Sanatório Partenon e da FIOCRUZ;**
- 5. Formação de profissionais vinculado ao projeto.**



*lucia-rossetti@saude.rs.gov.br*