



SOS STOOLBOX

Método Simples de processamento
de fezes One Step (SOS) e
o teste Xpert MTB/RIF (Ultra)
para a detecção do complexo
Mycobacterium tuberculosis
e resistência à rifampicina

PROCEDIMENTO
OPERACIONAL PADRÃO
(POP)

ÍNDICE

Abreviaturas usadas neste POP	4
1. Introdução	5
2. Propósito	5
3. Princípio	5
4. Equipe Responsável	7
5. Segurança	7
6. Materiais	7
7. Procedimento	8
7.1 Colheita de Amostras de Fezes	8
7.2 Preparação das Amostras de Fezes	10
7.3 Carregamento da amostra no cartucho Xpert MTB/RIF (Ultra)	10
8. Referências	12

ABREVIATURAS USADAS NESTE POP

ufc	unidades formadoras de colônia
DNA	ácido desoxirribonucleico
HIV	vírus da imunodeficiência humana
SI	sequência de inserção
LOD	limite de detecção
MDR	multirresistência (resistência à rifampicina e isoniazida)
FDSM	ficha de dados de segurança do material
MTB(C)	Mycobacterium tuberculosis (complexo)
PCC	controle de verificação da sonda
PCR	reação em cadeia da polimerase
PVHIV	peessoas vivendo com HIV
RIF	rifampicina
SOS	Simple One-Step
SPC	Controle de Processamento de Amostra
SA	Reagente de Amostra (fornecido pela Cepheid)
TB	tuberculose
OMS	Organização Mundial da Saúde

Procedimento Operacional Padrão (SOP) para detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e resistência à rifampicina em fezes usando o método de processamento de fezes Simple One-Step (SOS) e o teste Xpert MTB/RIF (Ultra)

1: Introdução

O diagnóstico de tuberculose pulmonar (TB) em crianças e pessoas vivendo com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (PVHIV) é prejudicado porque eles frequentemente apresentam sinais e sintomas não específicos e a confirmação laboratorial da doença é dificultada devido a sua natureza paucibacilar e a dificuldade de obter expectoração. Em 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou diretrizes atualizadas, nas quais inclui-se o uso do Xpert MTB/RIF de fezes como um teste diagnóstico inicial para detecção de TB e resistência à rifampicina (RIF) em crianças que apresentam sinais e sintomas de TB pulmonar ^{1,2}. Em ambientes com alta prevalência de TB (probabilidade pré-teste $\geq 5\%$), nos casos em que, no teste inicial, o resultado é negativo pode-se realizar outro teste, usando o ensaio Xpert MTB/RIF (obtendo um total de dois testes) Além disso, a OMS incentiva o uso do ensaio Xpert MTB/RIF Ultra, sob condições de pesquisa operacional ^{1,2}. Dois estudos recentes, de revisão sistemática, demonstraram que tanto o ensaio Xpert MTB/RIF quanto o, mais sensível, Xpert MTB/RIF Ultra podem ser utilizados para detectar bacilos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) em fezes, com alta especificidade ^{3,4}. Assim, os testes Xpert e Xpert Ultra em fezes podem ser usados como um teste padrão de regra próximo ao ponto de atendimento. Devido à alta sensibilidade e especificidade em comparação com o teste de Gene Xpert, de expectoração, as fezes provavelmente também podem ser usadas como uma alternativa à Expectoração, expectoração para o diagnóstico de TB em adultos, incluindo PVHIV, que não consigam expectorar expectoração ⁵. Vários métodos foram descritos para processar fezes por testes Xpert ⁶⁻¹². Entretanto, alguns desses

métodos são complexos, trabalhosos, demorados, incluem centrifugação e precisam de infraestrutura bem equipada ^{6,7,9}. Os métodos que não exijam centrifugação ^{8,10-12} incluem duas ou mais etapas de processamento de amostras e todos eles exigem suprimentos adicionais, reagentes e medidas de biossegurança específicas porque a amostra precisa ser manipulada antes que os bacilos de MTB sejam inativados. De Haas e outros 13 desenvolveram um método que utiliza os mesmos suprimentos e equipamentos usados no teste Xpert de expectoração e constitui apenas uma etapa de liberação-e-sedimentação: o método Simples One-Step (SOS) para a detecção de MTBC e resistência à RIF nas fezes. Esse método tem o potencial de aplicação abrangente do teste Xpert para a detecção de MTBC nas fezes ao nível dos cuidados de saúde primários.

2: Propósito

Este POP descreve procedimentos para coleta e processamento de amostras de fezes, usando o método SOS no ensaio Xpert MTB/RIF (Ultra) para a detecção de MTBC e resistência à RIF. Este documento não fornece orientação sobre o manuseio do instrumento de GeneXpert, desempenho do teste Xpert e interpretação dos resultados do Xpert.

3: Princípio

As fezes são um tipo de amostra alternativa para o diagnóstico de TB, pois a expectoração expectoração contendo MTBC ascende através da tosse e, posteriormente, engolida é enviada por meio do sistema gastrointestinal, terminando nas fezes. Ao usar o método SOS ¹³, o processamento de

fezes para uso no ensaio Xpert é tão simples quanto o processamento de expectoração expectoração ¹⁴. Aproximadamente 0,8 a 1,0 g de fezes são adicionados diretamente ao reagente de amostra, fornecido com o kit Xpert MTB/RIF (Ultra) (Cepheid, Califórnia, EUA) ^{14,15}, e esta mistura de Reagente de Amostra-Fezes é agitada vigorosamente. Durante esta etapa, as fezes se desintegram, as bactérias são libertadas para o Reagente de Amostra e os bacilos de MTBC são inativados. Subsequentemente, a sedimentação, por gravidade das fezes, ocorre durante a incubação da suspensão de Reagente de Amostra-Fezes, e os bacilos de MTBC permanecerão em suspensão. Após a suspensão do Reagente de Amostra-Fezes ter sido novamente agitado vigorosamente e incubado à temperatura ambiente, 2 mL desta suspensão são transferidos para o cartucho Xpert. A transferência deve ser feita com muito cuidado, evitando transferir qualquer partícula de fezes, pois isso pode causar o entupimento do filtro do cartucho. Além disso, as fezes podem conter mais inibidores de PCR do que a expectoração expectoração. Por essas duas razões, espera-se uma taxa mais alta de resultados inválidos/erros, do que para o teste de expectoração. O sistema de ensaio Xpert MTB/RIF permite a rápida detecção de MTBC e resistência à RIF por meio da combinação entre a purificação automatizada de amostra, amplificação de ácido nucleico e detecção de sequências de DNA alvo, em um cartucho independente, que é executado em um sistema GeneXpert ^{14,16}. Como os cartuchos são independentes, a chance de contaminação cruzada entre as amostras é minimizada. No cartucho de ensaio de Xpert MTB/RIF, ocorre um PCR em tempo real direcionados ao gene *rpoB*, contendo a região hot-spot de 81 pares de bases. O gene *rpoB* é sondado com cinco sinalizadores moleculares que permitem a diferenciação entre a sequência do tipo selvagem e mutações na região central que estão associadas a resistência à RIF. A Rifampicina é um dos medicamentos anti-TB de primeira linha mais potentes e a resistência a Rifampicina é um indicador para TB multirresistente (MR-TB). Um controle de processamento de amostra (SPC), compreendendo

esporos de *Bacillus globigii*, é incluído no ensaio como um controle interno para garantir o processamento adequado da amostra, bem como monitorar a presença de inibidores de PCR. Um controle de verificação da sonda (PCC) verifica a reidratação do reagente, o enchimento do tubo de PCR do cartucho, a integridade da sonda e a estabilidade do pigmento ^{14,16,17}.

O ensaio Xpert MTB/RIF Ultra usa o mesmo sistema GeneXpert do ensaio Xpert MTB/RIF e não mostrou ser inferior ao último ensaio ¹⁸, mas foi ajustado para aumentar a sensibilidade do ensaio para detectar o MTBC. O ensaio Ultra detecta o MTBC pela amplificação das sequências de inserção de múltiplas cópias (SI) IS6110 e IS1081 e usa um volume de reação de PCR maior do que o Xpert MTB/RIF (50 μ L contra 25 μ L de câmara de reação do PCR). O ensaio Ultra tem um limite de detecção (LOD) inferior ao Xpert MTB/RIF (16 contra 113 unidades formadoras de colônias bacterianas (ufc) por mL ¹⁹) porque usa a amplificação de ácido nucleico aninhado, ciclos térmicos mais rápidos e microfluidos aprimorados. O ensaio Xpert Ultra incorpora uma análise baseada em temperatura de fusão em vez de PCR em tempo real para a detecção de resistência à RIF. Especificamente, quatro sondas identificam mutações que conferem com a resistência à RIF no gene *rpoB*, deslocando a temperatura de fusão para longe do valor de referência do tipo selvagem ¹⁹.

4: Equipe Responsável

Equipe de laboratório treinada no processamento de fezes usando o método de SOS e o ensaio Xpert MTB/RIF (Ultra).

5: Segurança

- Trate todas as amostras como material biológico potencialmente infeccioso.
- Use sempre uma bata, óculos de proteção e luvas descartáveis.

- O tampão de reagente de amostra do kit Xpert contém as substâncias irritantes NaOH e isopropanol. Consulte as informações disponíveis na ficha de dados de segurança do material para obter mais detalhes ²⁰.
- O processamento da amostra deve ocorrer sob um exaustor ventilado ou em uma sala bem ventilada.
- Se ocorrer algum vazamento de fezes, a área afetada deve ser limpa com solução de hipoclorito de sódio 0,5% (água sanitária) e, posteriormente, com álcool 70%.
- Descarte todos os resíduos de risco biológico em uma lixeira de resíduos médicos.
- Consulte os regulamentos nacionais de segurança e gestão de resíduos de laboratórios de saúde específicos da sua região para obter mais considerações.

6: Materiais

Nota: Esta lista de materiais deve ser personalizada de acordo com as necessidades específicas de cada país.

- Recipientes de fezes descartáveis com tampa de rosca com uma colher (ou, alternativamente, recipientes/copos universais para expectoração ou urina com tampa de rosca).
- Papel higiênico ou papel filme para coleta de fezes (no caso de coleta de fezes no local).
- Saco plástico com material absorvente.
- Luvas descartáveis.
- Bata de laboratório.
- Óculos de proteção.
- Espátulas de madeira.
- Cronômetro.
- Caneta permanente.
- Solução de hipoclorito de sódio 0,5% e álcool 70% ou outro desinfetante tuberculicida.
- Kit Xpert MTB/RIF (Ultra), incluindo:
 - cartuchos de Xpert MTB/RIF (Ultra) descartáveis de uso único;
 - pipetas de transferência descartáveis estéreis;

- frascos com Reagente de Amostra.
- Pipetas de transferência estéreis sobressalentes com marcação de 2 mL (se houver muitas amostras de fezes líquidas).
- Instrumento GeneXpert com infraestrutura adequada, equipado com computador, software GX 4.7b e leitor de código de barras (Cepheid Inc. Sunnyvale, EUA).
- Impressora, se for necessário emitir um relatório do teste Xpert padrão.

7: Procedimento

Observações importantes antes de iniciar o processamento da amostra:

- Antes de iniciar o procedimento, limpe a mesa de trabalho com solução de hipoclorito de sódio 0,5% (água sanitária) e, posteriormente, com álcool 70%.
- Processe a quantidade de amostras de acordo com os módulos GeneXpert disponíveis para executar os testes.
- Evite o processamento simultâneo de várias amostra. Processe-as em uma série de uma a uma, no máximo, três amostras para evitar etapas de processamento concorrentes entre elas.
- Todas as amostras, frascos de reagente de amostra e cartuchos devem ser cuidadosamente rotulados com um número de identificador exclusivo do paciente (NID).
- O procedimento abaixo detalha as etapas para coleta, preparação e carregamento de amostras de fezes no cartucho Xpert MTB/RIF (Ultra) específico para o teste Xpert. Este documento não fornece orientação sobre o manuseio do instrumento GeneXpert, desempenho do teste Xpert e interpretação dos resultados do Xpert. Para essas etapas, podem ser usadas as instruções do fabricante para processamento de expectoração ou as instruções existentes no POP nacional para testes Xpert MTB/RIF.

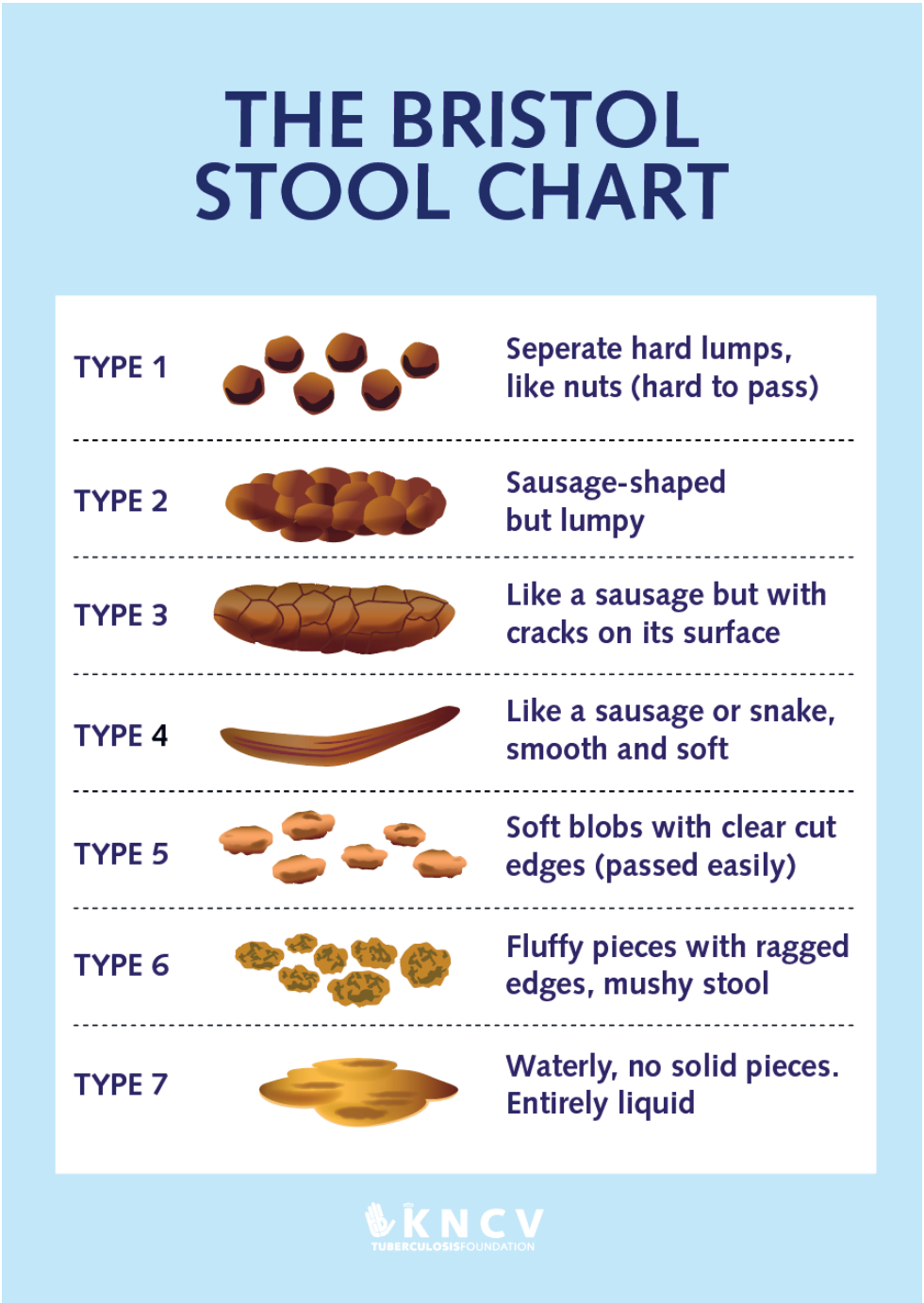


Figura 1.
A Escala de Fezes de Bristol, em homenagem à Universidade de Bristol, onde foi descrita pela primeira vez por Lewis e Heaton ²¹; é definida a partir do tipo 1, sendo o mais sólido, até o tipo 7, sendo o mais líquido.

7.1 Coleta de Amostras de Fezes

Geralmente, a coleta de fezes é feita pelos próprios pacientes ou, no caso de pacientes pediátricos, por seus cuidadores. A coleta pode ser feita na unidade sanitária ou na residência do paciente. Seguindo os procedimentos no ambiente local, o paciente ou cuidador deve ser instruído por uma enfermeira, um médico ou outra pessoa da equipe médica ou laboratorial sobre como coletar as fezes. Abaixo, descrevemos um método simples para coleta de fezes. Como alternativa, é possível usar kits de coleta de fezes.

1. Forneça um recipiente para fezes e um saco plástico com material absorvente para o paciente ou cuidador.
2. Forneça as seguintes instruções sobre como coletar a amostra de fezes para o paciente ou cuidador:
 - a. O ideal é coletar a amostra de fezes durante o primeiro movimento intestinal do dia. Esvazie a bexiga antes para evitar a mistura da amostra de fezes com a urina.
 - b. Coloque um pouco de papel higiênico ou um papel filme limpo no local onde as fezes serão depositadas para garantir uma amostra limpa. Evite que as fezes entrem em contato com o solo, detergente ou desinfetante do vaso sanitário.
 - c. Se as fezes de uma criança pequena precisarem ser coletadas, colete-as diretamente da fralda e o mais rápido possível após a defecação. Evite o contato prolongado com a superfície da fralda, pois alguns modelos podem conter substâncias desconhecidas que podem alterar o teste.
 - d. Encha até a metade do recipiente de fezes usando, por exemplo, a espátula fornecida em conjunto com o recipiente, um saco plástico limpo, um pedaço de papelão limpo ou uma colher limpa. Não encha o recipiente até a borda porque é difícil manuseá-los no laboratório. É necessária apenas uma pequena quantidade de fezes para o teste.
 - e. Feche bem o recipiente e lacre-o dentro do saco plástico fornecido. Deixe o material absorvente dentro do saco plástico, assim, ele pode absorver quaisquer substâncias que possam vazar do recipiente.

- f. Imediatamente após a coleta das fezes, guarde o recipiente de fezes em um local limpo e fresco (por exemplo, na geladeira, se disponível), evitando a exposição direta à luz solar. Não congele a amostra.
- g. De preferência, traga a amostra de fezes para o laboratório no mesmo dia da coleta.

7.2 Preparação das Amostras de Fezes

1. Logo após o recebimento, registre as datas e horários da coleta das fezes e da chegada ao laboratório.
2. Armazene os recipientes de amostras de fezes na geladeira (2-8 C) até que o teste possa ser realizado. Idealmente, a preparação da amostra e o teste devem começar o mais rápido possível, e as fezes não devem ser armazenadas por mais de 5 dias na geladeira ou 48 horas em temperatura ambiente.
3. Pegue um frasco contendo 8 mL de reagente de amostra do kit Xpert MTB/RIF (Ultra) e rotule-o com a Identificação exclusiva do paciente.
4. Antes do teste, determine a consistência da amostra de fezes usando a Escala de Fezes de Bristol²¹ (veja a figura 1) e registre no formulário do laboratório. O tipo de fezes determina a forma de manipulá-la; siga para a próxima etapa no caso de fezes dos tipos 1 a 5 ou para a etapa 6 no caso de fezes do tipo 6 ou 7.
5. Se as fezes forem do tipo 1 até 5 (tipos de fezes s da maioria das bolhas sólidas às moles) (figura 1):
 - a. Use a colher conectada à tampa do recipiente, ou uma espátula de madeira, para pegar uma porção das fezes do tamanho aproximado de uma unha (isso corresponde a 0,8 - 1 grama ou um aglomerado de aproximadamente 1 por 1,5 cm), conforme mostrado nas figuras 2A e 3A, e transfira-a para o frasco de Reagente de Amostra.
 - b. Use uma espátula de madeira para remover as fezes da colher ou da espátula, se necessário (veja a figura 3A).
 - c. Caso as fezes sejam do tipo 1 ou 2 (muito duras), então, uma vez transferidas para o frasco de Reagente de Amostra, corte-as cuidadosamente em pequenos pedaços usando uma espátula de madeira para garantir uma melhor suspensão no tampão de Reagente de Amostra. Certifique-se

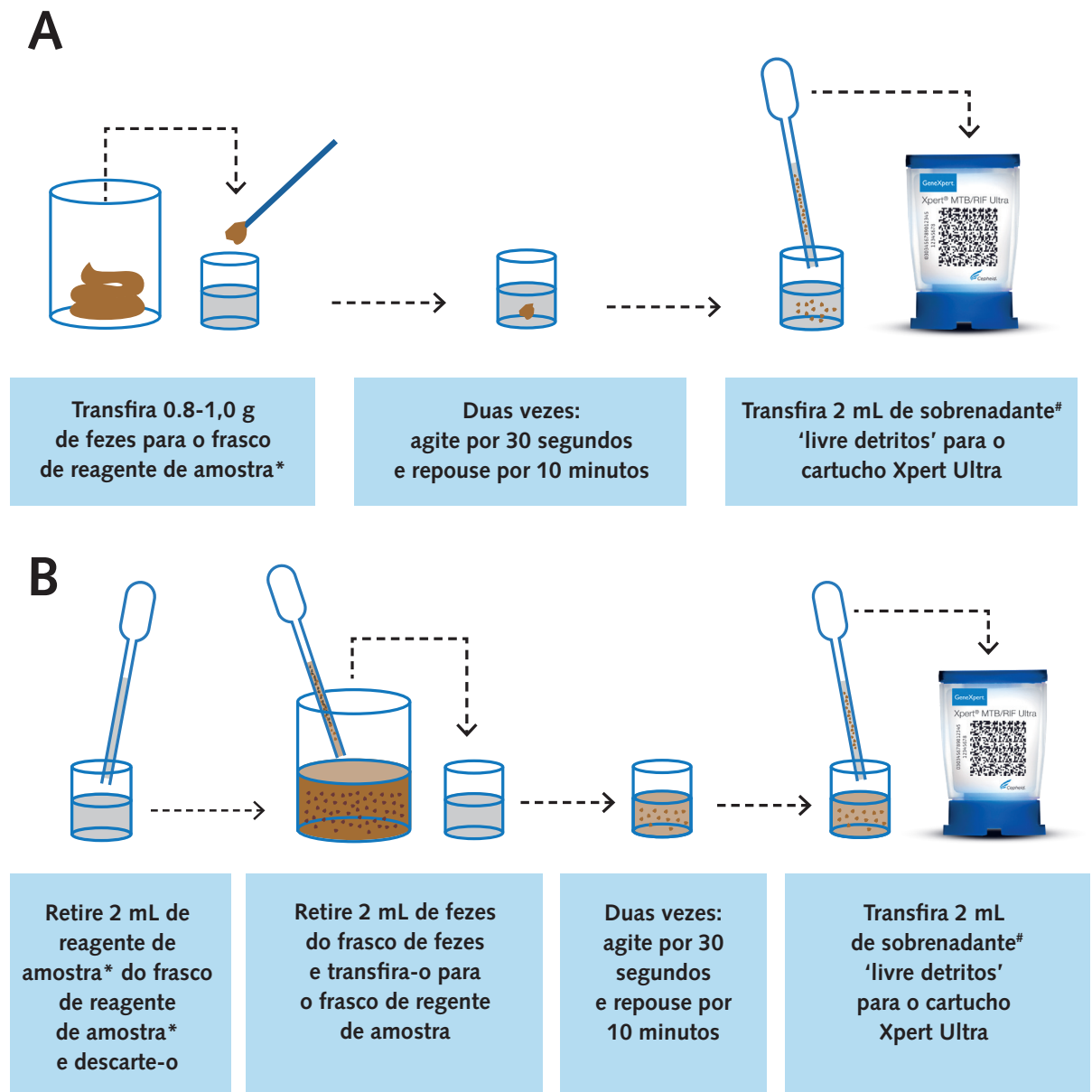


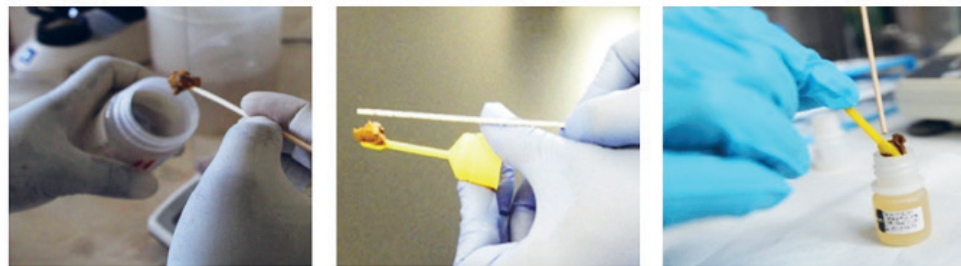
Figura 2.

Visão geral esquemática do POP para a detecção do complexo *M. tuberculosis* e resistência à rifampicina nas fezes usando o método de processamento de fezes SOS e o ensaio Xpert MTB/RIF (Ultra) para diferentes tipos de fezes. O painel A mostra o procedimento para fezes do tipo 1 a 5 de Bristol (fezes sólidas) e o painel B para fezes do tipo 6 e 7 de Bristol (fezes líquidas).

*Reagente de Amostra (Cepheid), 8 mL da mistura de hidróxido de sódio (pH>12,5) com isopropanol fornecido em conjunto com cada cartucho Xpert Ultra.

#Após a sedimentação por gravitação dos detritos orgânicos, cuidadosamente - sem levantar o frasco e sem perturbar a sedimentação - transfira 2 mL da camada superior do sobrenadante 'livres de detritos' para o cartucho de Xpert.

A



B

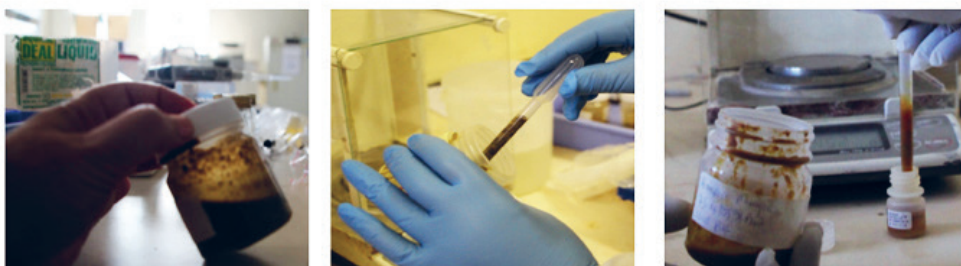


Figura 3.

Fotos de exemplos típicos de manipulação de fezes para o método de processamento de fezes SOS para o teste Xpert MTB/RIF. O painel A mostra imagens para fezes do tipo 1 a 5 de Bristol (sólidas); retirada de 0,8 g (aproximadamente 1 x 1,5 cm) com uma espátula de madeira (imagem à esquerda) ou uma colher de um recipiente de fezes (imagem do meio) e adição das fezes ao frasco de reagente de amostra com auxílio de uma espátula de madeira (imagem à direita). O painel B mostra imagens para fezes do tipo 6 e 7 de Bristol (fezes líquidas); um exemplo típico (imagem à esquerda), aspiração de fezes líquidas do frasco de fezes (imagem do meio) e adição de fezes ao frasco de reagente de amostra (imagem à direita).

A

B

C

D

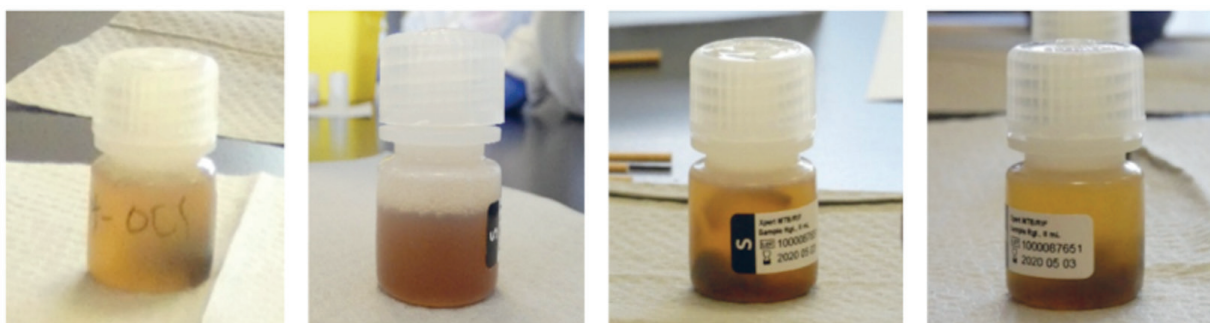


Figura 4.

Um exemplo de fezes misturadas com o reagente de amostra em um frasco de reagente de amostra; A) antes da agitação, B) depois da agitação, C) após a sedimentação incompleta, ou seja, ainda com algumas partículas sólidas no sobrenadante D) após a sedimentação, com um sobrenadante límpido.

de que a amostra de fezes não emerja de dentro do Reagente de Amostra durante o procedimento!

6. Se as fezes forem do tipo 6 ou 7 (pedaços macios com bordas irregulares (moles) e fezes aquosas (totalmente líquidas)) (figura 1), use uma pipeta de transferência para remover 2 mL de Reagente de Amostra do frasco e descarte-a. Subsequentemente, use a mesma pipeta para transferir 2 mL da amostra de fezes para o frasco de Reagente de Amostra (veja as figuras 2B e 3B).
7. Feche bem a tampa do frasco de Reagente de Amostra e agite o frasco vigorosamente por 30 segundos. *Não agite em círculos, pois isso pode formar uma suspensão estável de partículas finas, dificultando a sedimentação.*
8. Incube o frasco por 10 minutos em temperatura ambiente.
9. Agite a garrafa vigorosamente novamente por 30 segundos (não agite em círculos).
10. Desaperte ligeiramente a tampa de rosca do frasco de Reagente de Amostra e coloque o frasco em uma posição em que o sobrenadante possa ser facilmente aspirado na etapa 7.3.4.
11. Deixe o frasco descansar por 10 minutos em temperatura ambiente para permitir que as partículas sólidas e detritos se assentem.
12. Se os detritos de fezes não estiverem totalmente sedimentados, o tempo de incubação pode ser prolongado por mais 10 minutos.
13. Se ainda houver partes sólidas visíveis no sobrenadante (camada superior) após o tempo de incubação prolongado, repita as etapas 7 e 8 (veja a figura 4).

7.3 Carregamento da amostra no cartucho Xpert MTB/RIF (Ultra)

Nota: Em princípio, as amostras devem ser carregadas nos cartuchos Xpert MTB/RIF (Ultra) imediatamente após o seu processamento e, ao contrário do processamento de expectoraçãoexpectoração, não é recomendado reutilizar a suspensão de Reagente de Amostra-Fezes no frasco de reagente de amostra para testes repetidos, evitando o risco de aspiração de partículas da camada sedimentar. Normalmente, sobrar a amostra de fezes suficiente para processar outra porção da mesma amostra (a partir da etapa 7.2.4).

1. Rotule um cartucho Xpert MTB/RIF (Ultra) com o número de Identificação exclusiva do paciente.
2. Abra a tampa do cartucho.
3. Abra o frasco de reagente de amostra contendo a suspensão de Reagente de Amostra-Fezes. Para evitar que quaisquer detritos rodopiem para cima, não mova ou levante o frasco de Reagente de Amostra, mas segure-o com cuidado entre os dedos enquanto o apoia na mesa.
4. Usando uma nova pipeta, aspire cuidadosamente 2 mL do sobrenadante do frasco de reagente de amostra e transfira-o para o cartucho de Xpert MTB/RIF (Ultra), dispensando-o lentamente na abertura do cartucho.

Importante: tenha cuidado para não aspirar quaisquer detritos. Evite tocar nos detritos no fundo do frasco de reagente de amostra e não mova ou levante o frasco enquanto aspira o sobrenadante. Aspire o sobrenadante da camada superior e evite bolhas de ar. Você pode fazer isso da seguinte forma:

- a. Pressione a pipeta de transferência com força suficiente para aspirar os 2 mL de uma só vez.
- b. Coloque a ponta da pipeta logo abaixo da superfície da solução contra a parede do frasco e desça lentamente enquanto aspira a amostra para dentro da pipeta de transferência.
- c. Se, acidentalmente, bolhas de ar forem aspiradas para dentro da pipeta ou se o balão não tiver sido pressionado com força suficiente para absorver os 2 mL de uma só vez, então, transfira lentamente a solução de volta para o frasco de reagente de amostra, mantendo a ponta da pipeta contra a parede e sem levantar o frasco da mesa. Deixe o frasco de reagente de amostra descansar por 10 minutos para garantir que a sedimentação seja restabelecida antes de tentar novamente. Se não for possível retirar 2 mL da camada superior sem incluir detritos, repita as etapas 7 e 8 da seção anterior.

5. Feche a tampa do cartucho e a tampa do frasco de reagente de amostra.
6. Coloque o cartucho no instrumento GeneXpert e siga as instruções do fabricante na bula para processamento de expectoraçãoexpectoração^{14, 15, 22, 23} ou as instruções existentes no POP nacional para testes Xpert MTB/RIF.

8: Referências

1. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/who-consolidated-guidelines-on-tuberculosis-module-3-diagnosis---rapid-diagnostics-for-tuberculosis-detection> (2020).
2. World Health Organization. [WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: Diagnosis - Rapid diagnostics for tuberculosis detection](#) (2020).
3. MacLean, E. et al. Diagnostic accuracy of stool Xpert MTB/RIF for detection of pulmonary tuberculosis in children: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* 57, 1–12 (2019).
4. Mesman, A. W. et al. Diagnostic accuracy of molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pediatric stool samples: A systematic review and meta-analysis. *Tuberculosis* 119, 101878 (2019).
5. Mazidur Rahman, S. M. et al. Evaluation of xpert MTB/RIF assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in stool samples of adults with pulmonary tuberculosis. *PLoS One* 13, 1–12 (2018).
6. Nicol, M. P. et al. Xpert MTB/RIF testing of stool samples for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children. *Clin. Infect. Dis.* 57, 18–21 (2013).
7. Marcy, O. et al. Performance of Xpert MTB/RIF and alternative specimen collection methods for the diagnosis of tuberculosis in HIV-Infected children. *Clin. Infect. Dis.* 62, 1161–1168 (2016).
8. Banada, P. P. et al. A novel sample processing method for rapid detection of tuberculosis in the stool of pediatric patients using the Xpert MTB/RIF assay. *PLoS One* 11, 1–13 (2016).
9. Welay, S. H. et al. Stool as appropriate sample for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* by GeneXpert test. *Open J. Respir. Dis.* 04, 83–89 (2014).
10. Walters, E. et al. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* from stools in young children by use of a novel centrifugation-free processing method. *J. Clin. Microbiol.* 56, 1–13 (2018).
11. Lounnas, M. et al. Laboratory development of a simple stool sample processing method diagnosis of pediatric tuberculosis using Xpert Ultra. *Tuberculosis* 125, 102002 (2020).
12. Andriyoko, B. et al. Simple stool processing method for the diagnosis of pulmonary tuberculosis using GeneXpert MTB/RIF. *Eur. Respir. J.* 53, 30–32 (2019).
13. de Haas, P. & et al. The Simple One-Step (SOS) stool processing method for use with the Xpert MTB/RIF assay for a child-friendly diagnosis of tuberculosis closer to the point-of-care. Submitted for publication (2021).
14. Cepheid. Xpert MTB/RIF package insert.
15. Cepheid. Xpert MTB/RIF Ultra package insert. vols 301-5987 (2019).
16. Helb, D. et al. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. 48, 229–237 (2010).
17. Cepheid. GeneXpert quality controls for all Cepheid assays. vols D15044, Re.
18. World Health Organization. WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF (2017).
19. Chakravorty, S. 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. *MBio* 8, 1–12 (2017).
20. [Cepheid. Xpert MTB/RIF \(Ultra\) material safety data sheet.](#)
21. Lewis, S. J. & Heaton, K. W. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand. J. Gastroenterol.* 32, 920–924 (1997).
22. Bodmer, T. & Ströhle, A. Diagnosing pulmonary tuberculosis with the Xpert MTB/RIF test. *J. Vis. Exp.* 1–6 (2012) doi:10.3791/3547.
23. [Cepheid. GeneXpert DX system operator manual, software version 6.1 \(2019\).](#)