



UFES - UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS
PEDRO SOUSA DE ALMEIDA JÚNIOR

**Influência da terapia antituberculose sobre *Mycobacterium tuberculosis*
ativos e dormentes em amostras de escarro de pacientes com tuberculose
pulmonar**

VITÓRIA, 2019



UFES - UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PEDRO SOUSA DE ALMEIDA JÚNIOR

**Influência da terapia antituberculose sobre *Mycobacterium tuberculosis*
ativos e dormentes em amostras de escarro de pacientes com tuberculose
pulmonar**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Doenças Infecciosas.
Orientador: Prof. Dr. Moisés Palaci

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

A447i Almeida Júnior, Pedro Sousa de, 1986-
Influência da terapia antituberculose sobre Mycobacterium
tuberculosis ativos e dormentes em amostras de escarro de
pacientes com tuberculose pulmonar / Pedro Sousa de Almeida
Júnior. - 2019.
88 f. : il.

Orientador: Moisés Palaci.
Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Diagnóstico microbiológico. 2. Tuberculose. 3. Tuberculose
- Diagnóstico. 4. Tuberculose - Microbiologia. I. Palaci, Moisés.
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Dedicatória

Aos fortes de espírito...

Nasceste no lar que precisavas.

Vestiste o corpo físico que merecias.

Moras no melhor lugar que Deus poderia te proporcionar, de acordo com teu adiantamento.

Possuis os recursos financeiros coerentes com as tuas necessidades; nem mais, nem menos, mas o justo para as tuas lutas terrenas.

Teu ambiente de trabalho é o que elegeste espontaneamente para a tua realização.

Teus parentes e amigos são as almas que atraíste com tuas próprias afinidades.

Portanto, teu destino está constantemente sob teu controle.

Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís, buscas, expulsas, modificas tudo aquilo que te rodeia a existência.

Teus pensamentos e vontade são a chave de teus atos e atitudes, são as fontes de atração e repulsão na tua jornada vivencial.

Não reclames nem te faças de vítima. Antes de tudo, analisa e observa. A mudança está em tuas mãos. Reprograma tua meta, busca o bem e viverás melhor.

Francisco do Espírito Santo Neto

Agradecimentos

Primeiramente a minha mãe, guerreira de forças inimagináveis. Lutadora e persistente que me fez enxergar que a única forma que eu teria como vencer na vida seria erguendo a cabeça e lutando de frente contra tudo e contra todos.

Ao meu orientador, Dr. Moisés Palaci por tantas vezes ter acreditado em mim, mesmo quando nem eu mesmo acreditava. Por me surpreender diversas vezes com um relance de esperança quando a gente está perto de desistir.

Ao Luiz Guilherme, meu braço direito e esquerdo dentro do laboratório, a quem eu devo tudo! Sem ele eu nunca teria conseguido terminar o Doutorado. Muito além de um amigo de trabalho, um irmão de alma.

À Renata Lyrio e Solange Vinhas que, de maneiras completamente diferentes, me ajudaram a crescer como profissional: uma servindo de apoio nas horas mais difíceis, amiga e confidente; a outra me mostrando que a vida não tem que ser fácil e que o mundo exige muito da gente.

À todos os meus colegas de laboratório, que foram tantos durante todos esses anos, e que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao meu noivo, Ricardo Marques, que me apoiou muito na reta final do Doutorado, sempre do meu lado tentando me acalmar e disponível para o que fosse preciso.

**Influência da terapia antituberculose sobre *Mycobacterium tuberculosis*
ativos e dormentes em amostras de escarro de pacientes com tuberculose
pulmonar**

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma das doenças infectocontagiosas mais antigas do mundo cuja erradicação continua sendo uma desafio. Um dos maiores problemas relacionados à TB é a infecção latente em que o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) é encontrado em seu hospedeiro em um estado metabólico caracterizado como “dormência”. Neste estado, o microrganismo não é reconhecido pelo sistema imunológico e não é detectado pelos métodos convencionais de diagnóstico. Esse trabalho tem como objetivo detectar populações metabolicamente diversas de MTB em amostras de escarro de pacientes com TB pulmonar e analisar a influência da terapia antituberculose sobre estes bacilos. O objetivo secundário do estudo é verificar se populações de bacilos persistentes podem implicar em insucesso terapêutico. Para tanto, foi utilizada a técnica de diluição em placa de 48 poços, a qual calcula a quantidade de microrganismos por meio do cálculo de Número Mais Provável (NMP). O determina a quantidade de microrganismos que crescem em meio líquido (7H9) e em meio líquido após adição de filtrado de cultura líquida de MTB (FC). Adicionalmente, foram realizados métodos convencionais de diagnóstico, baciloscopia e culturas sólida e líquida. Amostras de escarro foram coletadas antes do início de tratamento (M0) e mensalmente até o final do tratamento (M1 a M6). Para assegurar uma diminuição na taxa de contaminação durante o procedimento, a utilização de higienizante oral (clorexidina 0,12%) foi padronizada. Os dados clínicos e epidemiológicos evidenciam que a população estudada é jovem ($39,6 \pm 19,4$), com Índice de Massa Corporal (IMC) dentro dos padrões internacionais de normalidade ($20,5 \pm 1,6$), sendo 57% dos pacientes do sexo masculino e 43% do sexo feminino. Os

sintomas mais frequentes foram tosse e febre, com tempo de evolução da doença em torno de 1 a 3 meses como período mais frequente (71% para cada). Os dados radiográficos demonstram que todos os pacientes possuíam imagens radiográficas sugestivas de TB, de caráter anormal, sendo que seis (86%) destes pacientes foram caracterizados com doença avançada e um (14%) com moderada, com mesma proporção encontrada em relação à cavitação. Os dados microbiológicos mostram que somente uma (20%) das culturas convencionais (Ogawa ou MGIT) permaneceu positiva para MTB após dois meses de tratamento. A análise dos dados indicou que 84% dos bacilos das amostras M0 e 98% das amostras M1-M4 são bacilos dormentes ou dependentes de FC. Ao analisar o efeito da terapia anti-TB sobre as diferentes populações de MTB nas amostras de escarro de pacientes em tratamento, foi observada uma diminuição progressiva na quantidade de microrganismos ao longo dos meses de tratamento, principalmente em relação aos microrganismos metabolicamente ativos. Dessa forma conclui-se que o uso de FC é uma ferramenta importante para a redução do tempo de positividade das culturas e que MTB na sua forma metabólica dormente é mais tolerante às drogas de primeira linha utilizadas no tratamento.

Palavras-chave: Tuberculose, diagnóstico, dormência, latência

**Influence of anti-tuberculosis therapy on active and dormant
Mycobacterium tuberculosis present in sputum samples from patients with
pulmonary tuberculosis**

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is one of the oldest infectious-contagious diseases in the world and the eradication of which remains a challenge. One of the major problems related to TB is the latent infection in which *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is found in its host in a metabolic state characterized as "numbness". In this state, the microorganism is not recognized by the immune system and is not detected by conventional diagnostic methods. This work aims to detect metabolically diverse populations of MTB in sputum samples of patients with pulmonary TB and to analyse the influence of tuberculosis therapy on these bacilli. The secondary objective of this study is to verify whether persistent bacilli populations may imply therapeutic failure. For this purpose, the 48 wells plate dilution technique was used, which determines the amount of microorganisms by calculating the Most Probable Number (MPN). The MPN determines the amount of microorganisms that grow in liquid medium (7H 9) and in liquid medium after the addition of liquid culture supernatant of MTB (SN). In addition, conventional diagnostic methods, bacilloscopy and solid and liquid cultures were performed. Sputum samples were collected prior to treatment (M0) and monthly until the end of treatment (M1 to M6). To lower the rate of contamination during the procedure, oral hygiene with chlorhexidine 0.12% was standardized. The preliminary clinical and epidemiological data show that the population studied is young (39.6 ± 19.4), with body mass index (BMI) within the international standards of normality (20.5 ± 1.6), being 57% male patients and 43% female. The most reported symptoms were cough and fever, with time of disease progression around 1 to 3 months as the most frequent period (71% for each). The

preliminary radiographic data indicate that all patients had radiographic images suggestive of abnormal TB, with six (86%) of these patients characterized with advanced disease and one (14%) with moderate, with the same proportion found in relation to cavitation. The microbiological data reveal that only one (20%) of the conventional cultures (Ogawa or MGIT) remained positive for MTB after two months of treatment. A preliminary analysis indicated that 84% of the bacilli of the samples M0 and 98% of the M1-M4 samples are dormant or SN-dependent bacilli. When analysing the effect of TB therapy on the different MTB populations in sputum samples of patients under treatment, a progressive decrease in the amount of microorganisms over the months of treatment was observed, mainly in relation to metabolically active microorganisms.

Keywords: Tuberculosis, diagnosis, dormancy, latency.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Modelo esquemático do procedimento de diluição de amostra em placa de 48 poços utilizando somente meio 7H9S (círculos em marrom) e 7H9S + filtrado de cultura (círculos em verde escuro).

Figura 2. Leitura semanal das placas de 48 poços do Ensaio de Diluição das amostras de escarro antes e durante o tratamento antituberculose.

Figura 3. Correlação entre a redução das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em relação à subpopulação de MTB dependente de FC (NPM+FC) no primeiro mês de tratamento: (A) Todos os pacientes; (B) Grupo 1; (C) Grupo 2.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados demográficos, clínicos e dos testes de triagem divididos de acordo com a severidade radiográfica da doença.

Tabela 2. Resultados de culturas das amostras de escarro coletadas mensalmente dos 17 pacientes acompanhados durante o tratamento anti-TB. Os pacientes foram organizados em grupos de acordo com os resultados microbiológicos.

Tabela 3. Avaliação da frequência de contaminação das culturas utilizando dois métodos distintos de higienização oral: água (padrão) *versus* gluconato de clorexidina 0,12%.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μm	Micrometro
BR	Bacilos ressuscitáveis
CHX	Digluconato de clorexidina 0,12%
CPC	Centro de Pesquisa Clínica
DLM	Ensaio de Diluição Limitante
DP	Desvio padrão
FC	Filtrado de Cultura
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes
IMC	Índice de Massa Corporal
LACEN-ES	Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo
K ⁺	Potássio
MDR	<i>Multiple Drug Resistance</i>
MGIT	<i>Mycobacteria growth indicator tube</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NALC	N-Acetil L-cisteína
NaOH	Hidróxido de sódio
NDI	Núcleo de Doenças Infecciosas
NMP	Número Mais Provável
NRP	<i>Non-replicating persistent</i>
OADC	Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase

OK	Ogawa-Kudoh
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
PANTA	Polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetropima, azlocilina
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
Rpf	<i>Resuscitation-promoting fator</i>
SFB	Soro fetal bovino
SigD	Fator sigma D
TB	Tuberculose
TDP	Tempo de positivação
UFC	Unidade Formadora de Colônias
VMNC	Viável mas não cultivável

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	TUBERCULOSE	18
1.2	DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE	19
1.3	TRANSMISSÃO DA TURBERCULOSE	20
1.4	TRATAMENTO.....	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO, INFECÇÕES PERSISTENTES E DORMÊNCIA	23
2.2	FATOR PROMOTOR DE RESSUSCITAÇÃO	25
2.3	ESTRUTURA E FUNÇÃO BIOQUÍMICA DO FATOR PROMOTOR DE RESSUSCITAÇÃO	27
2.4	DORMÊNCIA	28
2.5	DORMÊNCIA E ANTIBIOTICOTERAPIA	30
2.6	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	PACIENTES E MÉTODOS	36
4.1.2	<i>DESENHO DO ESTUDO</i>	36
4.1.2.1	<i>Plano de Trabalho</i>	36
4.1.2.2	Critérios de Inclusão e Exclusão de Sujeitos	37
4.2	AMOSTRAS E COLETA	38
4.2.1	AMOSTRAS	38
4.2.1.1	<i>Procedimento de Coleta</i>	38

4.2.1.2	<i>Utilização de Higienizante Oral para Coleta de Amostras</i>	39
4.3	CONTROLE DE TRATAMENTO	40
4.4	PROCESSAMENTO DE AMOSTRA	40
4.5	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	41
4.5.1	<i>Baciloscopia</i>	41
4.5.2	<i>Cultura do Escarro</i>	41
4.5.3	<i>Contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC)</i>	42
4.5.4	<i>Teste de Sensibilidade</i>	43
4.5.5	<i>Ensaio Utilizando o Sobrenadante Contendo Rpf</i>	44
4.5.5.1	<i>Preparo do sobrenadante</i>	44
4.5.5.2	<i>Ensaio em placa de 48 poços com Cálculo do Número Mais Provável (NMP)</i>	44
4.6	ASPECTOS ÉTICOS	47
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	RESULTADOS	49
5.1	DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, RADIOGRÁFICOS E TESTES DE TRIAGEM	44
5.2	CLASSIFICAÇÃO DOS GRUPOS DE PACIENTE DE ACORDO COM OS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS	50
5.3	UTILIZAÇÃO DO FILTRADO DE CULTURA	50
5.4	ENSAIO DE DILUIÇÃO LIMITANTE (LDM) COM CÁLCULO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)	51
5.5	HIGIENIZAÇÃO ORAL COM GLUCONATO DE CLOREXIDINA 0,12%	55
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	63
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

9	ANEXOS	75
----------	---------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

1.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma das doenças infectocontagiosas mais antigas do mundo e cuja erradicação continua sendo uma desafio. É causada pelo agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), um patógeno humano estrito que possui alta capacidade de causar necrose pulmonar e de sobreviver em focos latentes em indivíduos infectados (KESHAVJEE & FARMER, 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), um terço da população mundial é portadora da TB na sua forma latente (WHO, 2016). O boletim epidemiológico mais recente da OMS reportou aproximadamente 10,4 milhões de novos casos de TB em 2017, com 1,4 milhões de mortes, constituindo uma importante causa de morbidade e mortalidade mundial, apesar de ser passível de prevenção e cura (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). As mais altas incidências da doença estão geralmente associadas a fatores como: (1) baixo nível socioeconômico; (2) aglomerações; (3) desnutrição e; (4) pobreza, problemas enfrentados principalmente por países em desenvolvimento. Nas últimas quase quatro décadas, este panorama foi agravado com a pandemia do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e o surgimento de linhagens do MTB resistentes a drogas, resultante de terapias inadequadas e uso indiscriminado de antibióticos (RUFFINO-NETTO, 2002).

A tuberculose pulmonar constitui um sério problema de saúde pública no Brasil, assim como em outros países em desenvolvimento, pois indivíduos não diagnosticados são uma das principais fontes de disseminação da doença. A principal fonte de infecção é o indivíduo que apresenta a forma pulmonar da tuberculose e elimina bacilos para o ambiente. Calcula-se que durante um único ano numa comunidade, uma fonte de infecção poderá transmitir a doença

para, em média, 10 a 15 contatos (RIEDER, 2001). Apesar de a TB ser uma doença tratável, somente no Brasil, no ano de 2016 foram registrados 4.426 óbitos por TB. Isto significa que a cada 100 mil cidadãos brasileiros, mais de dois morreram por TB naquele ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2017). Portanto, a TB constitui uma das principais doenças infecciosas que devem estar em constante vigilância por meio do financiamento de pesquisas avançadas que colaborem com o melhor tratamento e erradicação da mesma, com consequente economia para a saúde pública.

1.2 DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE

Por se tratar de um exame rápido e de baixo custo, a baciloscopia constitui a principal forma de diagnóstico da TB, principalmente nos países de maior incidência. Esta técnica possui sensibilidade subótima (aproximadamente 50% com limite de detecção de 10^4 bacilos por mL de amostra). Mediante a impossibilidade de adoção de métodos mais sensíveis de diagnósticos em alguns centros, existem alternativas que aumentam a sensibilidade da técnica, como o uso de fluorescência e de microscópios com lâmpadas de LED (WHITELAW *et al.*, 2011).

Devido à baixa sensibilidade do método de baciloscopia, os laboratórios dispõem de uma alternativa de alto valor diagnóstico, a cultura. Esta técnica pode ser realizada por meio de inoculação direta ou após processamento do escarro em meios de cultura sólidos a base de ágar ou ovo ou em meios de cultura líquidos (FURIN & JOHNSON, 2005; CAMPOS, 2006; (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008). A cultura em meio líquido utilizando automação (que apresenta limite de detecção de aproximadamente 10 bacilos por mL) é considerada a metodologia padrão-ouro para confirmação diagnóstica da tuberculose. É uma

técnica bastante sensível, porém possui alto custo e é mais propensa a contaminação do que métodos que utilizam meio de cultura sólido (CHIEN *et al.*, 2000).

Outros testes confirmatórios utilizados para diagnóstico utilizam a amplificação de ácidos nucleicos, sendo o Xpert MTB/RIF® um dos mais utilizados por apresentar boa sensibilidade em amostras com baciloscopia positiva (89%), necessitar de pouco treinamento para ser implantado e ser custo-efetivo em áreas endêmicas (LANGLEY *et al.*, 2014). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde endossou a utilização de uma nova versão do Xpert MTB/RIF®, denominado ULTRA, que apresentou aumento de sensibilidade de aproximadamente 17% nos casos de baciloscopia negativa e 14% em pacientes HIV positivos (DORMAN *et al.*, 2017).

1.3 TRANSMISSÃO DA TUBERCULOSE

A transmissão da tuberculose ocorre através da inalação por um indivíduo suscetível de gotículas infectantes liberadas através principalmente do espirro, fala e/ou tosse por indivíduos com tuberculose (WELLS, 1934; CHURCHYARD *et al.*, 2017). Tais eventos liberam gotículas de diversos tamanhos: as mais pesadas se depositam rapidamente no ambiente e as mais leves permanecem em suspensão no ar ou então evaporam. Somente os núcleos secos das gotículas (núcleos de *Wells*) com diâmetros de até 5 µm e com 1 a 2 bacilos viáveis em suspensão conseguem atingir os bronquíolos e alvéolos, podendo assim iniciar o processo de infecção do indivíduo suscetível (WELLS, 1934). Porém, o risco de transmissão não está relacionado apenas à densidade de bacilos no ar inspirado, mas também à frequência, duração e intensidade do contato com um indivíduo com doença ativa, bem como o estado imunológico do indivíduo suscetível (SUDRE, DAM & KOCHI, 1992).

Em mais de 90% dos casos, o patógeno está presente em um estado de infecção assintomática latente, com risco de evolução para doença ativa de aproximadamente 5% nos primeiros 18 meses após a infecção e 5% no restante da vida (ZUMLA *et al.*, 2013). Os indivíduos sem manifestações clínicas são reservatórios de MTB em sua forma não-replicativa. Em alguns desses casos, o microrganismo pode retornar à forma replicativa, o que constitui uma das principais causas do aumento no número de casos de TB atualmente (WALLIS *et al.*, 2016; KONDRATIEVA *et al.*, 2014). Pouco se sabe sobre os mecanismos de proteção imunológica e patogênese da TB latente, o que dificulta a modulação bioquímica dos eventos relacionados à reativação da doença, o desenvolvimento de vacinas e esquemas terapêuticos adequados (KAUFMANN, 2010).

1.4 TRATAMENTO

A tuberculose é uma doença curável apesar de ser grave, e o seu tratamento consiste na combinação de vários fármacos. O tratamento atual da tuberculose é constituído de duas fases, sendo a fase intensiva realizada com doses diárias de rifampicina (R) 150 mg, isoniazida (H) 75 mg, pirazinamida (Z) 400 mg, etambutol (E) 275 mg por 4 meses, seguida da fase de manutenção com doses diárias de RIF e INH por mais 2 meses (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2019). O esquema básico está indicado para todos os casos novos de adultos e adolescentes (>10 anos), de todas as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar, com exceção de meningoencefalite, infectados ou não por HIV, além dos casos de retratamento (recidiva ou retorno após abandono). Os demais casos devem ser tratados com esquemas específicos para meningoencefalite, esquemas para mono/polio ou multirresistência ou esquemas especiais para presença de comorbidades. (Referência)

Embora denominado de tratamento de curta-duração, o tempo é a principal desvantagem da terapia, com taxas de abandono entre 7% e 54% após a quarta semana (KRUK, SCHWALBE & AGUIAR, 2008).

Uma das estratégias utilizadas para melhorar a adesão dos pacientes ao tratamento é a Terapia Assistida Orientada (do inglês *Directly Observed Therapy* – DOT) em que o paciente recebe orientação e supervisão do tratamento por um profissional de saúde. Entretanto, o DOT possui alto custo para o sistema público de saúde e para os pacientes. Um estudo de meta-análise que comparou o resultado do DOT em relação ao tratamento de administração própria reportou que não houve diferença entre os dois em relação à cura, recidiva e emergência de resistência (FRIEDEN & SBARBARO, 2007).

Além da evasão, outra grande preocupação em relação ao tratamento é a atividade dos fármacos utilizados em bacilos com baixa taxa metabólica, que são responsáveis pela infecção latente (KONDRATIEVA *et al.*, 2014). Dos fármacos utilizados na terapia anti-TB, somente a pirazinamida possui conhecida atividade *in vitro* sobre o MTB dormente. No entanto outros experimentos *in vitro* revelaram que a rifampicina possui relativa atividade sobre estes microrganismos (WAYNE & SOHASKEY, 2001), o que ajuda a sustentar o tratamento recomendado pela OMS para TB latente que inclui INH por 6 a 9 meses, RIF e INH por 3 a 4 meses ou rifapentina (RIFP) e INH por três meses em países com alta taxa de incidência da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2019). Todos estes regimes parecem ter excelentes resultados e são recomendados principalmente para adultos e crianças que tiveram contato com pessoas com TB pulmonar ativa ou pacientes iniciando terapia com anti-TNF em diálise com doença renal avançada em preparação para transplante hematológico ou de órgão. Apesar de ser recomendado para o tratamento da TB latente, nenhum dos regimes citados é capaz de eliminar o MTB

completamente do seu hospedeiro, sendo este capaz de permanecer indetectável em reservatórios ainda pouco conhecidos (CAÑO-MUÑIZ *et al.*, 2018).

Atualmente existem duas novas drogas (bedaquilina e delamanida) em fase 3 de teste e três outros novos compostos (sutezolida, oxazolidinona e pretomanida) também em processo de avaliação para utilização em infecções TB-MDR (do inglês *Multiple Drug Resistance*). Existem também alguns protocolos em fase 2 de desenvolvimento utilizando diferentes regimes terapêuticos e drogas com reconhecida ação anti-TB, como a rifapentina, a rifampicina e as fluorquinolonas, mas que visam principalmente otimizar ou definir seus papéis na terapia da TB sensível à droga (WALLIS *et al.*, 2016).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO, PERSISTÊNCIA E DORMÊNCIA

A capacidade dos microrganismos de persistirem em estados metabolicamente inativos em seu hospedeiro ou no ambiente garante a sua sobrevivência em condições desfavoráveis e, provavelmente, contribui para a diversidade microbiana ao facilitar a riqueza taxonômica em sistemas pobres em nutrientes (DWORKIN & SHAH, 2010). Condições desfavoráveis incluem privação de nutrientes (BETTS *et al.*, 2002; XIE; SIDDIQI; RUBIN, 2005; ANUCHIN *et al.*, 2009), temperaturas extremas, dessecação, presença de agentes antimicrobianos como lisozima, ambientes hipóxicos (WAYNE; SOHASKEY, 2001) e ácidos (HEIFETS; SANCHEZ, 2000). Oliver em 2005 listou aproximadamente 60 microrganismos que são capazes de entrar em um estado em que são denominados como “viáveis mas não-cultiváveis” (VMNC), no qual o microrganismo não cresce em meios de cultura em que rotineiramente cresceria (OLIVER, 2005). Vários destes são patógenos humanos e alguns

deles são encontrados na forma de partículas celulares resistentes como esporos, a exemplo do *Bacillus anthracis* e do *Clostridium difficile* (STEPHENSON; LEWIS, 2005).

Apesar de não formar esporos, o MTB pode entrar em um estado de baixa replicação e sobreviver no hospedeiro humano por vários anos (LILLEBAEK *et al.*, 2002). Há muito é reconhecido o papel importante da dinâmica metabólica do MTB em relação à infecção. Porém, somente em 2002, testes moleculares revelaram a longa persistência do MTB no hospedeiro, a exemplo de um indivíduo que sofreu reativação da doença 33 anos após a infecção primária (LILLEBAEK *et al.*, 2002).

A persistência do MTB no hospedeiro por anos pode ser explicada pela modificação estrutural e epigenética das células bacterianas, desenvolvendo formas que são menos imunogênicas (PEDDIREDDY, DODDAM & AHMED, 2017) e com padrão de expressão gênica diferente das formas replicantes (VOSKUIL, VISCONTI & SCHOOLNIK, 2004). Essas células entram em um estado metabólico denominado de dormência, em que frequentemente diminuem de tamanho (ANUCHIN *et al.*, 2009), apresentam espessamento da parede celular (WAYNE & SOHASKEY, 2001), modificam seu comportamento em relação ao metabolismo de macromoléculas (GENGENBACHER & KAUFMANN, 2012) e apresentam perfil de tolerância às drogas utilizadas no tratamento da TB (LORAINE *et al.*, 2016; SARATHY *et al.*, 2018).

Essas células bacterianas podem sobreviver dentro de macrófagos e células dendríticas, bem como em outros reservatórios incomuns, como células epiteliais não-fagocíticas, fibroblastos e adipócitos (EHLERS, 2009). Um bom reservatório de MTB no estado de dormência são microgranulomas presentes no pulmão de pessoas com infecção latente. Nestes indivíduos, pode ocorrer um equilíbrio estático onde há pouca ou nenhuma replicação do microrganismos (EHLERS, 2009). Porém, o tecido pulmonar também pode apresentar formas

replicantes de MTB que estimulam células T, especialmente na área mais externa dos granulomas em estruturas neolinfóides (ULRICHS *et al.*, 2004).

Ainda há muita especulação sobre esse assunto, principalmente por falta de modelos experimentais que possam acompanhar *in vivo* a mudança de infecção latente para uma infecção ativa. Tem sido alimentado o senso comum em que o MTB encontra-se em constante transição entre os estados metabólicos ativo e dormente. Diversos autores procuram desenhar modelos teóricos para explicar esse balanço entre os diferentes estados metabólicos. O modelo “yin-yang” proposto por Zhang e colaboradores (2007) sugere que dentro da subpopulação de bacilos dormentes existe uma fração de bacilos metabolicamente ativos e vice-versa, e que de acordo com a pressão de fatores externos como o sistema imunológico e/ou presença de drogas, esses bacilos podem transitar entre os dois estados metabólicos (ZHANG, 2007). Outro modelo teórico sugere a existência de bacilos denominados de “escoteiros”, que sentem as condições do ambiente e promovem a replicação de bacilos dormentes próximos, levando à reativação da doença (CHAO & RUBIN, 2010). Estes bacilos podem surgir de forma aleatória/espontânea ou por ação de uma família de proteínas com características enzimáticas secretadas pelo próprio MTB, denominada de fatores promotores de ressuscitação (rpf) (CHAO & RUBIN, 2010; MUKAMOLOVA *et al.*, 1998, 2002)

2.2 FATOR PROMOTOR DE RESSUSCITAÇÃO

A descoberta do rpf foi realizada por Kaprelyants e colaboradores (1993) ao verificarem que *Mycrococcus luteus*, um coco gram positivo não formador de esporo, secreta uma substância capaz de promover a ressuscitação de outros microrganismos, como *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Leifsonia*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Kitasatospora*, *Streptomyces* e *Mycobacterium* (KAPRELYANTS, GOTTSCHAL & KELL, 1993). Mais tarde, Mukamolova e

colaboradores (1998) caracterizaram esse componente encontrado no sobrenadante de cultura líquida de *M. luteus* que é capaz de aumentar a contagem de colônias de culturas extensivamente lavadas e com dificuldades de crescimento (MUKAMOLOVA *et al.*, 1998). Experimentos posteriores demonstraram que o rpf é capaz de ressuscitar bactérias gram negativas, como o *Curvibacter fontanus* sp. (DING & YOKOTA, 2010), além de reportar que outras bactérias gram-negativas, como a *Salmonella typhimurium* LT2, também são capazes de produzi-la (PANUTDAPORN *et al.*, 2006).

O rpf representa um grupo de proteínas secretadas com a capacidade de estimular o crescimento de microrganismos em concentrações picomolares. *M. luteus* possui um único gene codificante de rpf que é essencial para seu crescimento *in vitro*, ao passo que outras actinobactérias podem possuir vários genes do tipo rpf (KAPRELYANTS *et al.*, 2012). No entanto, nem todos necessitam das proteínas codificadas por esses genes para seu crescimento *in vitro*. O MTB possui cinco genes da família rpf (*rpfA-E*), e foi demonstrado que a deleção individual ou coletiva dos genes não diminui o crescimento do microrganismo *in vitro*, sugerindo a redundância de função do seu respectivo conjunto de proteínas (DOWNING *et al.*, 2004; KANA *et al.*, 2008).

Estudos subsequentes demonstraram, contudo, que a deleção combinada de dois ou mais genes da família rpf impactou no crescimento dos mutantes *in vivo* com a mutação $\Delta rpfA\Delta rpfB$ apresentando maiores efeitos deletérios em relação à cinética de reativação do microrganismo do que a mutação $\Delta rpfB\Delta rpfD$ (RUSSELL-GOLDMAN *et al.*, 2008). Esta mesma mutação também se mostrou importante para a virulência do MTB, pois foi demonstrado em modelo murino que mutantes em que estes genes *rpf* foram deletados apresentaram virulência reduzida (BIKETOV *et al.*, 2000). Downing e colaboradores (2004) primeiramente demonstraram que a deleção individual de quaisquer dos genes *rpfA-E* é seguida de aumento na regulação dos outros genes *rpf*. Entretanto, o mesmo grupo de

pesquisadores demonstrou em posteriores estudos com mutantes que os genes *rpf* remanescentes não compensam a perda de outros genes *rpf* por aumento na regulação transcricional, sugerindo que esses genes são regulados por mecanismos distintos (DOWNING *et al.*, 2005). Estas pesquisas foram essenciais para que fosse posteriormente descrita uma hierarquia funcional dentro da família de genes *rpf* em MTB, em que os genes *rpfB* e *rpfE* mostraram-se mais importantes no processo de ressuscitação do que o gene *rpfD* em relação a características fenotípicas (KANA *et al.*, 2008).

Análises de perfis transcricionais revelaram um aumento na expressão de todos os genes *rpf* durante as fases iniciais da ressuscitação de bactérias dormentes, porém com diferentes expressões e importâncias nos estágios finais de ressuscitação (GUPTA, SRIVASTAVA & SRIVASTAVA, 2010). Os genes *rpfA* e *rpfD* apresentam maior expressão nas fases iniciais da ressuscitação, e *rpfC* é o único que apresenta aumento consistente na expressão durante todas as fases de crescimento em modelo de privação de nutrientes (GUPTA, SRIVASTAVA & SRIVASTAVA, 2010).

Estudos relacionados ao tema mostram ainda que diferentes genes *rpf* são mais fortemente expressos de acordo com o modelo experimental de dormência adotado. Foi verificado que o estresse ácido induz o aumento na expressão dos genes *rpfD* e *rpfE* e o modelo de hipóxia, dos genes *rpfC* e *rpfE* (GUPTA; SRIVASTAVA & SRIVASTAVA, 2010).

2.3 ESTRUTURA E FUNÇÃO BIOQUÍMICA DO FATOR PROMOTOR DE RESSUSCITAÇÃO

As proteínas *rpf* possuem um sinal N-terminal, o que sugere que estas são exportadas e translocadas através da parede para o meio extracelular. Apesar deste domínio conservado, as

sequências amino e carboxi terminais das proteínas são diferentes (MUKAMOLOVA *et al.*, 2002). RpfA possui uma sequência C-terminal rica em prolina e alanina, enquanto que rpfB possui sítios de ligações de lipoproteínas na extensão N-terminal. Tais diferenças estruturais estão associadas com a modulação funcional, especificidade/seletividade de substrato e interação com outras proteínas (KANA & MIZRAHI, 2010).

RpfB interage com uma endopeptidase micobacteriana designada em inglês de *rpf-interacting protein A* (ripA). As duas proteínas se localizam no septo de células em divisão ativa sugerindo um papel do complexo ripA-rpfB na hidrólise de peptideoglicanos durante a divisão celular. RipA também se liga a rpfE, porém não tem interação com rpfA, rpfC e rpfD, corroborando mais uma vez a hipótese de que cada proteína age em uma via distinta no processo de ressuscitação (HETT *et al.*, 2007). Foi demonstrado *in vitro* que a expressão de *rpfC*, o gene responsável pela maior expressão de rpf em MTB (MUKAMOLOVA *et al.*, 2002), é regulada por SigD (fator Sigma D), que tem sua produção aumentada em resposta à falta de nutrientes. O aumento na produção de SigD e expressão de *rpfC* em modelos experimentais de falta de nutrientes indicam que estes estão envolvidos na adaptação e persistência na fase estacionária (GUPTA; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2010).

Dessa forma, ao analisar e comparar dados de vários estudos, Gupta e colaboradores (2010) sugeriram que *rpfC* e *rpfE* possuem um papel importante na sobrevivência do MTB durante a persistência induzida por hipóxia. Além disso *rpfD* e *rpfE* influenciam na adaptação do MTB em condições de estresse induzido por ambiente ácido, indicando que o *rpfE* é importante para a sobrevivência do microrganismo em condições de estresse induzidas por falta de oxigênio e baixo pH, microambiente encontrado no interior dos granulomas e em fagossomos de macrófagos, e potenciais reservatórios de MTB em estado de dormência (GUPTA, SRIVASTAVA & SRIVASTAVA, 2010).

2.4 DORMÊNCIA

Existem fortes evidências de que a TB latente está intimamente ligada ao MTB em seu estado de dormência, e que nesta condição pode ocorrer uma inibição acentuada ou mesmo uma supressão total do seu metabolismo (FLYNN & CHAN, 2001). Alguns modelos experimentais já descritos procuram mimetizar os microambientes prováveis em que o MTB se encontra no hospedeiro, sendo a baixa tensão de oxigênio e a privação de nutrientes uns dos modelos mais utilizados (DUTTA & KARAKOUSIS, 2014). Já foi demonstrado nesses modelos experimentais que o MTB é capaz de sobreviver por longos períodos em um estado não-replicativo (WAYNE & HAYES, 1996), o que pode ser responsável pela persistência do microrganismo no hospedeiro. A suposição mais comum é que o MTB resida em lesões granulomatosas fibróticas dentro do pulmão, e que o ambiente de baixa tensão de oxigênio e com escassez de nutrientes o mantém no estado de dormência (WAYNE & HAYES, 1996). Entretanto, DNA do microrganismo foi encontrado em tecido pulmonar de indivíduos sem evidência de doença ativa ou prévia (HERNÁNDEZ-PANDO *et al.*, 2000), sugerindo que existem outros fatores relacionados à existência e manutenção do MTB em estado de dormência, como a pressão do sistema imunológico.

Mais recentemente, após a descoberta da família de proteínas rpf, observou-se que existe uma população oculta de bactérias não-cultiváveis em amostras de escarro de pacientes com TB pulmonar (MUKAMOLOVA *et al.*, 2010). Essa descoberta foi possível através da utilização de meio de cultura suplementado com sobrenadante de cultura líquida de MTB, que contém, além de outras substâncias (enzimáticas e não-enzimáticas), as proteínas rpf (CHENGALROYEN *et al.*, 2016). Chengalroyen e colaboradores (2016) demonstraram recentemente a existência de diversas subpopulações de MTB, que podem sub-classificadas de acordo com sua dependência de fatores exógenos, dentro eles as proteínas rpf. Devido à

incapacidade atual de distinguir fenotipicamente essas subpopulações (ROSSER *et al.*, 2017), todos os microrganismos capazes de ressuscitar a partir da adição de sobrenadante de cultura líquida de MTB serão denominados de “dependentes de sobrenadante”, conferindo uma visão mais ampla das populações micobacterianas que são isoladas a partir da utilização deste recurso.

Foi demonstrado que a população de MTB dependente de sobrenadante em escarro de pacientes nas fases iniciais de tratamento se torna mais proeminente à medida que a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de MTB não dependente de sobrenadante diminui. Dessa forma, a população de micobactérias dependentes de sobrenadante são eliminadas até 20 vezes mais lentamente do que a população metabolicamente ativa (MUKAMOLOVA *et al.*, 2010).

2.5 DORMÊNCIA E ANTIBIOTICOTERAPIA

A importância de uma terapia antimicrobiana eficaz é evidenciada pelos atuais desafios da resistência genotípica e tolerância fenotípica aos medicamentos. A eficácia dos antimicrobianos depende de muitos fatores, tais como a capacidade de ativar respostas de estados de déficit de nutrientes, interações célula-célula em populações heterogêneas, interação patógeno-hospedeiro e o estado metabólico do microrganismo (TURAPOV *et al.*, 2014a).

Em se tratando de TB, os fármacos disponíveis para tratamento da doença são bastante eficazes *in vitro*, resultando numa morte bacteriana rápida. Porém, esse efeito não é reproduzido *in vivo*, motivo pelo qual o tratamento é realizado em duas fases, por seis meses. Pacientes não tratados com o regime recomendado durante os seis meses apresentam maior risco de recidiva (XIE, SIDDIQI & RUBIN, 2005).

O efeito de cada droga sobre as diferentes subpopulações de MTB encontradas em pacientes com TB pulmonar foi demonstrado por Mitchinson (1985), que descreveu 4 tipos diferentes de MTB segundo seu estado metabólico e susceptibilidade A drogas. Em seu modelo teórico, propôs que o bacilo da TB poderia ser encontrado em 1) estado de crescimento ativo (em que a isoniazida teria ação sobre o mesmo), 2) estado de semidormência inibidos por ambientes ácidos (em que a pirazinamida teria ação), 3) estado de semidormência com breves episódios de reativação metabólica (ação preferencial da rifampicina) e 4) estado de dormência completa, onde não ocorre inibição relacionada a drogas (MITCHISON, 1985). Definição semelhante foi proposta por Fiuza de Melo & Afiune (1993) em que as populações foram classificadas em 1) população intracelular com crescimento lento, 2) população extracelular com crescimento intermitente, 3) população de multiplicação rápida e 4) população dormente.

O modelo apresentado por Mitchinson (1985) elucidada o efeito de cada droga utilizada no tratamento antiTB, entretanto não explica algumas particularidades do tratamento, como a utilização de rifampicina e isoniazida durante a fase de manutenção do tratamento, em que são utilizadas as duas drogas por 4 meses com o intuito de eliminar os bacilos persistentes. Zhang (2007) propôs um novo modelo teórico denominado de Yin-Yang, em que postula que cada uma das duas populações de MTB (em divisão e em não-divisão) possuem subpopulações distintas, capazes de reverter o estado metabólico de cada uma dessas populações. Assim, os bacilos em plena divisão possuem uma subpopulação de bacilos persistentes tolerantes às drogas anti-TB, enquanto que os bacilos persistentes possuem uma subpopulação de bacilos “revertores” que seriam alvo da rifampicina e isoniazida (ZHANG, 2007).

Em dois novos modelos que procuram explicar a dinâmica populacional de MTB em pacientes com TB pulmonar, há a descrição da infecção como uma processo dinâmico entre

os bacilos dormentes e metabolicamente ativos. O primeiro hipotetiza um modelo em que micronódulos contendo MTB em estado de dormência são drenados, ocasionando reinfecções com ativação metabólica do MTB, o que o tornaria susceptível à isoniazida e rifampicina, desde que o microrganismo seja genotipicamente sensível (CARDONA, 2010). O segundo sugere que alguns bacilos podem ressuscitar espontaneamente ou após sinalização com moléculas como o rpf. Estes bacilos, denominados de sentinelas, seriam capazes de sentir o microambiente em que o MTB se encontra em busca de boas condições de crescimento (o que seria baixo dentro de granulomas sólidos). Ao encontrar melhores condições (como em granulomas caseosos), os sentinelas seriam responsáveis pela ressuscitação dos bacilos dormentes, provavelmente por intermédio da liberação de rpf (CHAO & RUBIN, 2010). Ambos os modelos explicam em partes o grau variado de susceptibilidade do MTB a drogas que não teriam ação sobre o bacilo em seu estado de dormência.

Para mimetizar os microambientes encontrados pelo MTB no hospedeiro que o induzem à dormência, foram realizados vários estudos *in vitro* (WAYNE & SOHASKEY, 2001; BETTS *et al.*, 2002; XIE, SIDDIQI & RUBIN, 2005; MUKAMOLOVA *et al.*, 2010;). Estes modelos experimentais utilizam ferramentas que promovem um estado de tolerância do MTB às drogas sob várias condições, como alteração de pH e privação de oxigênio e nutrientes. Entretanto, a falta de um modelo unificado, padronizado que submeta o MTB a todos os agentes nocivos em que ele é submetido no hospedeiro leva à divergência de resultados. É observado, por exemplo, que um mesmo composto possui perfis diferentes de sensibilidade dependendo do modelo experimental utilizado (XIE, SIDDIQI & RUBIN, 2005). Um dos modelos experimentais mais utilizados atualmente é o de múltiplo estresse, que parece ser o que mais se aproxima do microambiente em que o MTB se encontra no hospedeiro (DEB *et al.*, 2009).

Apesar da discordância de alguns resultados, há senso comum em relação à tolerância

fenotípica às drogas do MTB em estado de dormência. Além disso, foi possível também isolar MTB de amostras aparentemente estéreis de pacientes pós-tratamento (MUKAMOLOVA *et al.*, 2010), o que comprova que o tratamento utilizado atualmente é eficaz contra a doença ativa, porém incapaz de esterilizar a infecção. O fato é que a população de bacilos dependentes de sobrenadante parece representar um obstáculo no tratamento da TB, uma vez que estes podem ser a origem de recidivas e que necessitem de tempo maior de tratamento para a cura clínica (ROSSER *et al.*, 2017). Conforme relatado anteriormente, foi demonstrado que bacilos da TB dependentes de sobrenadante são mais tolerantes a algumas drogas, como rifampicina, isoniazida e estreptomicina, e que esta população desaparece mais lentamente das amostras de escarro. Portanto, é possível que seja necessária a depuração total desta população para que haja cura, mediante estudos comprobatórios (ROSSER *et al.*, 2017). Se esta hipótese for verdadeira, a quantificação de bacilos dependentes de sobrenadante durante a terapia pode ser utilizada como biomarcador de resposta ao tratamento e constituir um melhor preditor de eficiência de potenciais novos agentes anti-TB (TURAPOV *et al.*, 2016).

2.6 JUSTIFICATIVA

A TB continua sendo um problema grave de saúde pública, mesmo após anos de esforços internacionais por parte da OMS e entidades governamentais e não governamentais para tentar erradicá-la. Um dos principais problemas atuais da doença está na reativação do MTB que se encontra em sua forma não-replicativa, dormente. Essa preocupação se dá principalmente porque cerca de um terço da população está infectada por este microrganismo e porque o envelhecimento da população e as taxas oscilantes de infecção por HIV ameaçam o sucesso do plano global END-TB, que tem como um dos pilares a redução de 95% dos casos de morte por TB até 2035 (WHO, 2014).

Os investimentos acordados neste novo encontro estão sendo em parte direcionados ao desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, novas drogas, regimes terapêuticos e vacinas que visam principalmente alcançar as subpopulações de MTB dormentes. O uso de rpf na sua forma recombinante já demonstrou que pode ser útil na diminuição do tempo de positividade de culturas líquidas (HUANG *et al.*, 2014), e parece ser uma ferramenta promissora na avaliação da eficácia terapêutica de pacientes com TB pulmonar. Entretanto, nenhum estudo foi realizado até o momento sobre o acompanhamento da eficácia das drogas sobre essas subpopulações.

Com o advento de técnicas para crescimento de bacilos não-cultiváveis, entretanto, novos estudos estão sendo conduzidos para o desenvolvimento de compostos que possuam ação sobre esta subpopulação específica. Alguns dos compostos que já estão em teste são: lassomicina e derivados de capreomicina, em fase I e II de testes, respectivamente (GAVRISH *et al.*, 2014; SIRICILLA *et al.*, 2014); e pretomanida e bedaquilina, em fase III de testes (BALD & KOUL, 2010; HAAGSMA *et al.*, 2009).

Paradoxalmente, apesar dos dados epidemiológicos que indicam forte correlação entre a reativação dos casos de TB latente e a manutenção das altas taxas da doença, não há relatos de nenhum protocolo em andamento de avaliação da eficácia do tratamento anti-TB em bacilos dormentes. Entretanto, essa abordagem é de extrema importância pois a persistência do Mtb em amostras biológicas pode ser preditiva de recidiva ou indicativa de falha terapêutica.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a influência da terapia antituberculose sobre *Mycobacterium tuberculosis* ativos e dormentes em amostras de escarro de pacientes com tuberculose pulmonar

3.2 ESPECÍFICOS

- 1) Quantificar populações metabolicamente diversas de MTB (ativas e dormentes) em amostras de escarro de pacientes com TB pulmonar e analisar a influência da terapia antituberculose sobre estas;
- 2) Verificar se os pacientes apresentam a mesma dinâmica de eliminação das subpopulações (ativas e dormentes) de MTB durante o tratamento;
- 3) Verificar se populações de bacilos dormentes persistentes após o segundo mês de tratamento podem implicar em insucesso terapêutico;
- 4) Avaliar e validar um método de higienização oral com clorexidina para obtenção de amostras de escarro a serem utilizadas no método de Número Mais Provável.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PACIENTES E MÉTODOS

4.1.2 DESENHO DO ESTUDO

Este se trata de um estudo longitudinal em que foi avaliada a dinâmica das subpopulações de MTB (metabolicamente ativos e dependentes de sobrenadante) em amostras de escarro espontâneo de pacientes portadores de tuberculose pulmonar, antes, durante e ao término do tratamento.

4.1.2.1 Plano de Trabalho

No período de Outubro de 2016 a Maio de 2018, todos os indivíduos adultos (≥ 18 anos) com suspeita de TB pulmonar atendidos nas Unidades de Atendimento Primário à Saúde e Regional de Saúde, no anexo metropolitano de Vitória foram considerados potenciais participantes do estudo. Após a realização de exames de rotina para diagnóstico (baciloscopia e/ou XPERT MTB/RIF[®]), com posterior confirmação da doença e avaliação dos critérios de inclusão e exclusão (citados no item 4.1.2.2), o paciente tornou-se elegível para o estudo.

Uma vez selecionado, o paciente foi encaminhado ao Centro de Pesquisa Clínica do HUCAM (CPC-HUCAM). A equipe do estudo descreveu em detalhe o protocolo, o sistema de proteção ao sujeito da pesquisa e os dados/amostras a serem coletados do paciente. Nesta ocasião, foi solicitado ao paciente o seu consentimento para participar do estudo. Cada paciente foi cadastrado assim que os critérios de consentimento e elegibilidade foram confirmados. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por todos os

pacientes participantes (Anexo 1), assim como o questionário epidemiológico e clínico (Anexo 02), para fins de coleta de informações relevantes ao estudo.

4.1.2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão de Sujeitos

A) *Inclusão de Casos com suspeita de TB:* Todos os casos atendem a um ou mais dos seguintes critérios de inclusão:

- Indivíduo com 18 anos ou mais;
- Diagnóstico de tuberculose pulmonar confirmado (avaliação clínica e teste molecular Xpert MTB/RIF);
- Paciente de acordo com o retorno para as coletas de escarro mensais;
- Paciente de fácil contato por telefone ou visitas não agendadas (no caso de impossibilidade de retorno pontual para coleta de escarro mensal).

B) *Critérios de Exclusão de Sujeitos:*

- HIV positivos ou recusa em submeter-se ao teste de triagem para HIV;
- Histórico anterior de tratamento para TB;
- Casos de TB com perfil de não-adesão ao tratamento escolhido pelo clínico;
- Pacientes portadores de outras doenças de base ou formas graves de tuberculose (com hemoptise, comprometimento pulmonar) ou extrapulmonar;
- Gestantes;
- Indivíduo em situação de privação de liberdade;
- Indivíduos em situação de rua;
- Incapacidade de produzir escarro.

4.2 AMOSTRAS E COLETA

4.2.1 AMOSTRAS

Para a avaliação da presença das diferentes populações de MTB nas amostras de escarro espontâneo dos pacientes arrolados no estudo, foram coletadas 1) uma amostra de escarro antes do início do tratamento (M0) e 2) uma ou duas amostras mensais (M1 a M6) em dias consecutivos durante os seis meses de tratamento. Quando era possível coletar duas amostras de escarro em dias consecutivos, o procedimento de higienização oral era realizado de acordo com o disposto no item 4.2.1.2.

Para avaliação do valor preditivo dos resultados obtidos durante o tratamento como uma melhor ferramenta de real negatificação da cultura e/ou eficácia do tratamento, foi realizada coleta de amostra de escarro após dois meses do término do tratamento (M8) dos pacientes com isolamento de MTB a partir das amostras M2.

4.2.1.1 Procedimento de Coleta

Para a coleta da amostra de escarro, os pacientes foram primeiramente instruídos a não realizar a higienização oral ao acordar. A adequada assepsia e higienização da boca foi orientada e supervisionada pelo corpo de enfermagem do CPC utilizando somente água, evitando assim o uso de pasta de dente de qualquer natureza, o que pode interferir na detecção de bacilos nas amostras de escarro. A coleta de escarro foi assistida de forma a evitar possíveis manuseios indevidos do pote de coleta, diminuindo assim o risco de contaminação. Todas as amostras de escarro espontâneo foram coletadas em frasco de boca larga estéreis, de

acordo com a recomendação do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008). Os pacientes foram orientados a continuar a coleta até que alcançassem o volume mínimo de 3,0 mL de escarro. Tal amostra foi imediatamente colocada em refrigerador de 2 a 8°C até o transporte para o laboratório. Todas as amostras foram processadas no mesmo dia.

Na ocorrência de eventualidades de qualquer natureza que impediram o paciente de retornar ao CPC para coleta de escarro assistida, todos os esforços foram tomados para evitar a não coleta da amostra de escarro. Nestes casos, a coleta foi realizada de forma domiciliar por um profissional da área da saúde devidamente treinado. Todas as medidas de boas práticas no momento da coleta, armazenamento e transporte de amostras biológicas foram adotadas.

4.2.1.2 Utilização de Higienizante Oral para Coleta de Amostras

Devido à alta taxa de contaminação das culturas realizadas a partir de escarro de pacientes em tratamento, que pode chegar até a 40% (PERES *et al.*, 2011), foi adotada uma medida de higienização oral com solução de clorexidina 0,12% sem álcool (Periogard® – Colgate) com o intuito de diminuir a quantidade de microrganismos contaminantes provenientes da microbiota oral (PERES *et al.*, 2011). Dessa forma, dos pacientes em que foi possível coletar duas amostras de escarro em dias consecutivos, estes foram instruídos a 1) coletar uma amostra após a higienização oral com clorexidina 0,12% e 2) coletar outra amostra da forma convencional como descrito no item 4.2.1.1. A ordem de coleta foi realizada após randomização simples.

4.3 CONTROLE DE TRATAMENTO

O tratamento anti-TB foi realizado em todos os pacientes de acordo com o preconizado por diretrizes internacionais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2019), consistindo na administração por dois meses de quatro antibióticos – isoniazida (INH), rifampicina (RIF), ethambutol (EMB) e pirazinamida (PZA), seguida por administração de INH e RIF por mais quatro meses.

O controle de tratamento foi realizado por meio de ligações semanais, durante as quais os pacientes foram questionados sobre a correta conduta do tratamento, interrupções ocasionais do mesmo, bem como possíveis efeitos adversos. Os pacientes foram instruídos a retornar com a caixa do medicamento que lhes foi dispensado naquele mês para conferência pelos profissionais envolvidos na pesquisa, sempre que possível. O tratamento assistido orientado (DOT) foi realizado para todos os pacientes atendidos na Unidade de Saúde de Maruípe, sendo que estes retornaram diariamente durante os primeiros 15 dias para medicação assistida pelos profissionais de saúde local. Após este período inicial, os mesmos retornaram uma vez ao mês para tratamento assistido e conferência da medicação. Na impossibilidade do paciente de retornar com tal frequência à unidade de saúde, um parente era escolhido para supervisionar a administração do medicamento, devendo informar as ocorrências aos profissionais de saúde.

4.4 PROCESSAMENTO DE AMOSTRA

As amostras de escarro foram coletadas em frasco estéril, armazenadas em local refrigerado e enviadas ao Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas em até duas horas após a coleta. Para conferência das características e medição do

volume, as amostras de escarro foram transferidas para um tubo cônico de 50 mL e digeridas pela técnica de NALC/NaOH, conforme proposto pelo Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (2008) para as análises microbiológicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008).

4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

4.5.1 *Baciloscopia*

Os esfregaços e exames microscópicos do escarro para pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) foram realizados de forma rotineira de acordo com as recomendações técnicas descritas no Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008). Após processamento pelo método descrito no item 4.5.2, descrito abaixo, 100 µL da amostra foram dispostos em lâmina de vidro previamente identificada. A alíquota passou por processo de fixação em chapa aquecedora por no mínimo 1 h, com posterior coloração pelo método de auramina-O. Este método consiste na adição de solução de auramina fenicada, de forma a cobrir toda a lâmina, reação por 20 minutos, posterior adição da solução descorante (álcool-ácido 1%) com tempo de ação de dois minutos e, seguida de adição da solução de permanganato de potássio por 1 minuto. Após lavagem com filete de água corrente para retirar o excesso, foi feita a leitura das lâminas já secas.

4.5.2 *Cultura do Escarro*

A cultura semiquantitativa foi realizada pelo método de N-Acetil-L-Cisteína-Hidróxido de Sódio (NALC-NaOH), também de acordo com o Manual Nacional de Vigilância

Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008). Esse constitui na adição do mesmo volume de solução de NALC-NaOH (sob concentrações de NALC 0,05%, NaOH 2% e Citrato de Sódio 1,45%) em relação ao escarro, seguindo um período de reação de 15 min. Após a digestão, a amostra foi tamponada com Tampão Fosfato pH 6,8 (PBS) e centrifugação a 3.000xg por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o centrifugado reconstituído com PBS, no volume aproximado de 2,0 a 2,5 mL. Em seguida, uma alíquota de 0,2 mL do centrifugado foi incorporado ao meio de cultura sólido Ogawa e 0,5mL foi adicionado ao tubo de BBL™ MGIT™ previamente preparado com antibiótico BBL™ PANTA™, segundo as recomendações do fabricante. As culturas sólidas passaram por leitura semanal até 8 semanas e o tubo de MGIT™ permaneceu no equipamento de leitura por até 42 dias.

4.5.3 Contagem de Unidade Formadora de Colônias (UFC)

O procedimento de quantificação da carga bacilar foi realizado em placa de 48 poços. Para tanto, 7 diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}) foram preparadas por meio da adição de 0,5 mL da amostra em 4,5 mL de meio de cultura líquido 7H9 (Difco™). Uma alíquota de 10 µL de cada poço e de cada diluição foi inoculada separadamente em placas quadripartidas contendo ágar 7H11 (Difco™) e suplementadas com antibióticos (SIGMA-ALDRICH®) nas seguintes concentrações finais: polimixina B (200 UI/mL), carbenicilina (50 µg/mL), trimetoprim (20 µg/mL), anfotericina B (10 µg/mL) e soro fetal bovino inativado (SFB). A diluição e o plaqueamento das alíquotas seguiram o padrão descrito na Figura 1.

As colônias foram quantificadas entre os dias 21 e 28 após inoculação, em diluições com 10 a 100 colônias visíveis. Após a escolha da diluição, a quantificação das UFC correspondeu

à média das contagens. Após a leitura das placas, os dados referentes à contagem e sua respectiva diluição, para uma mesma amostra, foram utilizados para o cálculo do número de bacilos por mL de sedimento por meio da seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL de sedimento} = (\text{n}^\circ \text{ colônias em } 30 \mu\text{L}) \times [33,3 \times (1000 \mu\text{L}/30 \mu\text{L})] \times (1/\text{diluição})$$

Devido ao volume final do sedimento da amostra processada ser menor que o volume inicial, a quantificação de UFC/mL do sedimento deve ser corrigida para esta concentração. Portanto, o cálculo do número de bacilos por mL de escarro é atualizado da seguinte forma:

$$\text{Concentração (UFC/mL) da amostra original corrigida} =$$

$$(\text{UFC/mL do sedimento} \times \text{Volume do sedimento})/\text{Volume da amostra}$$

4.5.4 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

Todos os isolados de MTB das amostras de escarro coletadas antes do início do tratamento foram encaminhadas para o Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Espírito Santo (LACEN-CE) para realização de Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) utilizando o BACTEC® MGIT® 960 SIRE KIT, segundo as recomendações do fabricante. Os isolados foram inoculados em meio BACTEC™ MGIT™ e incubados no sistema BACTEC™ 960 até a positivação e em seguida foi realizado o teste de sensibilidade para as drogas estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol.

Em caso de isolamento de MTB a partir das amostras de controle após pelo menos dois meses de tratamento, o isolado foi reencaminhado para TSA para análise fenotípica de resistência (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008).

4.5.5 Ensaio Utilizando Filtrado de Cultura Líquida de MTB (FC)

4.5.5.1 Preparo do sobrenadante

O fator promotor de ressuscitação é uma proteína que pode ser encontrada no filtrado de culturas líquidas de MTB (MUKAMOLOVA *et al.*, 2002). Para a obtenção deste produto, foi realizada uma pré-cultura de cepa referência MTB H37Rv em meio 7H9 suplementado com 10% de OADC (v/v), 0,2% de glicerol (v/v) e 0,05% de Tween 80 10% (w/v). A pré-cultura foi incubada sob agitação (100 rpm) a 37°C até alcançar a densidade ótica 0.5 (580 nm). Em seguida, foi preparada uma nova cultura utilizando uma alíquota da pré-cultura, onde o crescimento foi acompanhado até a densidade ótica 0.8 a 1.0 (580 nm).

A cultura foi submetida a centrifugação por 15 min a 3.000xg com subsequente filtração do sobrenadante duas vezes por um filtro de porosidade 0,22 µm. O filtrado foi aliqotado em tubos de centrífuga de 15 mL (alíquotas de 6 mL), liofilizado segundo as recomendações do fabricante do liofilizador de bancada FeeZone, e congelado em freezer -80°C até a utilização, por no máximo dois meses.

4.5.5.2 Ensaio de Diluição Limitante (DLM) com cálculo de Número Mais Provável (NMP)

Para a realização do ensaio comparativo entre o crescimento das diferentes populações de MTB em placa, utilizou-se o método de DLM. Preparou-se uma placa de 48 poços, cujas 3 primeiras colunas foram preenchidas com 0,45 mL de meio 7H9 suplementado com OADC

(BD™ BBL™) e antibióticos (7H9S) nas concentrações finais: polimixina B (15,6 U/mL), ácido nalidíxico (6,24 µg/mL), trimetoprim (1,56 µg/mL), anfotericina B (1,56 µg/mL) e azlocilina (1,56 µg/mL), e cujas 3 últimas columnas foram preenchidas com 0,45mL de 7H9S adicionado de sobrenadante (v/v). Em cada poço da primeira linha da placa foram adicionados 0,5 mL de amostra processada, seguido de diluição seriada até 10⁻⁷. Diretamente da amostra e de cada poço das três primeiras columnas da placa de 48 poços, foram retirados 10µL que foram aplicados em placas de 7H11 contendo antibióticos nas concentrações finais: polimixina B (200 UI/mL), carbenicilina (50 µg/mL), trimetoprim (20 µg/mL), anfotericina B (10 µg/mL) e SFB, para a contagem de UFC/mL. As diluições e o plaqueamento das diluições foram realizados como demonstrado na Figura 1. A imagem mostra também o esquema de plaqueamento em placas de 7H11 + SFB dos poços contendo amostra diluída somente em 7H9S. Em experimentos preliminares foi observado que o plaqueamento dos poços contendo meio de cultura com adição de filtrado de cultura não reproduz o crescimento dos bacilos dormentes observados na placa de 48 poços, pela inativação imediata do rpf após inoculação em meio sólido, razão pela qual não foi realizado o plaqueamento dos poços representados por círculos verdes.

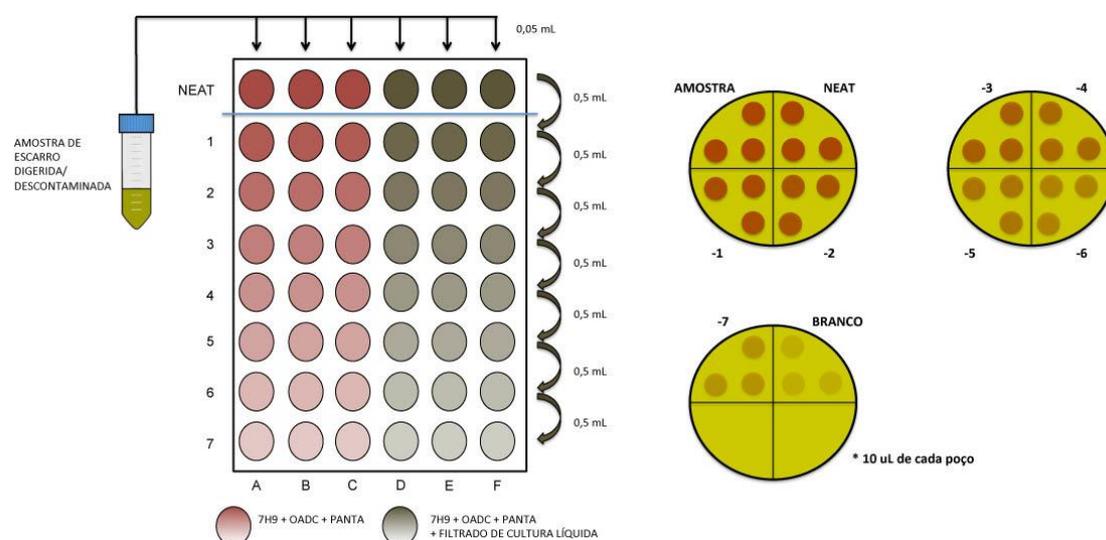


Figura 1. Modelo esquemático do procedimento de diluição de amostra em placa de 48 poços utilizando somente meio 7H9S (círculos em marrom) e 7H9S + filtrado de cultura (círculos em verde escuro).

A avaliação da carga bacilar das amostras de escarro foi realizada segundo as recomendações de modificação da metodologia de DLM propostas por Chengalroyen e colaboradores (2016), pois em experimentos anteriores foi verificado que o uso da placa de 48 poços de forma horizontal resulta numa contagem de bacilos dependentes de sobrenadante maior do que o limite de detecção da técnica. Como medida preventiva, foi proposta a utilização da placa de 48 poços na orientação vertical, de forma que ao invés de quatro replicatas de cada ensaio com 06 (seis) diluições cada, utilizou-se três replicatas com oito diluições por ensaio, ganhando duas diluições para contagem de bacilos através do cálculo do Número Mais Provável (Figura 2). Com essa alteração de conformação, o limite superior de detecção da técnica ficou definido como $4,8 \times 10^7$ NMP.

A alteração da orientação da placa acrescentou duas diluições para o ensaio e diminuiu uma replicata, portanto os resultados de NMP serão acompanhados de aumento do desvio padrão e, conseqüentemente, aumento na faixa do intervalo de confiança (95%). As placas foram incubadas em saco plástico à temperatura de 37°C com leitura semanal até completar oito semanas e o NMP foi calculado com o auxílio do Programa de Cálculo para NMP, disponível online (<http://www.wiwiss.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/wilrich/index.html>).

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi realizado segundo as diretrizes preconizadas na Resolução 196/96 (Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos) do Conselho Nacional de Saúde e da Orientação Operacional para Revisão Ética de Pesquisas relacionadas à Saúde com Participantes Humanos da OMS. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (número de referência 1.501.892).

Procedimentos foram adotados pelos responsáveis por este estudo a fim de proteger as informações dos pacientes. As informações foram mantidas em local reservado com acesso exclusivo aos pesquisadores. Após o término deste estudo, as informações foram transcritas dos questionários para arquivos no computador com acesso restrito dos pesquisadores envolvidos.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram processados e analisados utilizando os softwares estatísticos R (versão 3.4.3), IDE RStudio (versão 1.0.153) e o pacote de otimização *nlme* para a otimização dos modelos não-lineares.

Para a determinação de carga bacilar máxima nos ensaios de crescimento de MTB, foi realizado um ajuste das médias dos logaritmos por intermédio da otimização do modelo de crescimento de Gompertz (GOMPertz, 1825; ZWIETERING *et al.*, 1990). Os parâmetros otimizados foram utilizados para a avaliação da significância estatística ($p < 0,05$) entre o crescimento de MTB nos diferentes meios de cultura por meio de teste de permutação. A força da associação linear entre variáveis contínuas, como redução de UFC, NPM e NPM+FC nos primeiros meses de tratamento, foi medida por coeficiente de terminação R^2 .

O teste de Wilcoxon Signed-Rank foi utilizado para avaliar a correlação entre o aumento na taxa de ressuscitação e a porcentagem de bacilos ressuscitados durante o primeiro mês de tratamento após a adição de FC.

5. RESULTADOS

5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, RADIOGRÁFICOS E TESTES DE TRIAGEM

Vinte e dois pacientes com tuberculose pulmonar foram arrolados no estudo. Destes, quatro pacientes foram excluídos precocemente devido ao uso de substâncias de abuso e um paciente foi excluído por ter interrompido o tratamento no segundo mês. O estudo foi concluído com 17 pacientes que foram acompanhados mensalmente durante todo o tratamento anti-TB. Os dados demográficos, clínicos e dos testes de triagem estão sumarizados na Tabela 1, na qual os pacientes foram divididos de acordo com a extensão da doença.

Tabela 1. Dados demográficos, clínicos e dos testes de triagem de acordo com a extensão da doença.

Característica	Extensão da doença (%)	
	Moderadamente avançado (%) n=4	Avançado (%) n=13
Média da idade em anos \pm DP	39 \pm 15,5	39,7 \pm 17
Gênero		
Masculino (%)	2 (50)	9 (69)
Feminino (%)	2 (50)	4 (31)
Média do IMC (kg/m ²) \pm DP	21,7 \pm 3,9	21,9 \pm 2,6
Carga bacilar pela microscopia (%)		
Negativa	1 (25)	3 (23)
1+ to 2+	0 (0)	4 (31)
3+	3 (75)	6 (46)
Resultado de amplificação Xpert MTB/RIF®		
Muito baixo	0 (0)	1 (8)
Baixo	2 (50)	3 (23)
Médio	1 (25)	7 (54)
Alto	1 (25)	2 (15)

DP = desvio padrão ; IMC = índice de massa corporal

5.2 CLASSIFICAÇÃO DOS GRUPOS DE PACIENTE DE ACORDO COM OS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

De acordo com os resultados obtidos após a avaliação dos ensaios microbiológicos, os pacientes foram divididos em três grupos 1) Grupo 1, pacientes com culturas positivas em culturas de amostras de escarro M1 e/ou M2; 2) Grupo 2, pacientes que foram capazes de converter a cultura após o primeiro mês de tratamento (negativos nas culturas de escarro M2) e; 3) Grupo 3, pacientes paucibacilares, com crescimento de MTB na placa de 48 poços do ensaio LDM apenas no meio 7H9+CF (Tabela 3).

5.3 UTILIZAÇÃO DO FILTRADO DE CULTURA

O crescimento das populações dependente e independente de FC foi acompanhado em placa de 48 poços semanalmente para a avaliação do efeito da adição do FC em meio de cultura líquido, em relação à positividade e carga bacilar. A Figura 2 mostra que a adição de FC reduz o tempo que a cultura precisa para atingir o limiar máximo de carga bacilar, assim como aumenta a quantidade de bacilos na contagem final (semana 8). Para isto, utilizou-se o modelo de crescimento de Gompertz, que determinou o efeito durante as oito semanas de acompanhamento.

A Figura 2 mostra a curva de crescimento de MTB durante as oito semanas de acompanhamento, onde cada ponto da curva é representado pela média dos crescimentos obtidos dos 17 pacientes e do desvio padrão associado. O modelo de Gompertz indicou um aumento de 30% na carga bacilar após a adição de FC nas culturas realizadas a partir de amostras de escarro coletadas antes do início do tratamento (M0) ($p=0.0005$), e de 35% nas culturas realizadas a partir de amostras de escarro coletadas após um mês de tratamento (M1)

($p=0.0977$). Além disso, houve crescimento de MTB em amostras de escarro coletadas após dois meses de tratamento de três pacientes, sendo que em dois deles só foi possível obter crescimento de MTB após a adição de FC.

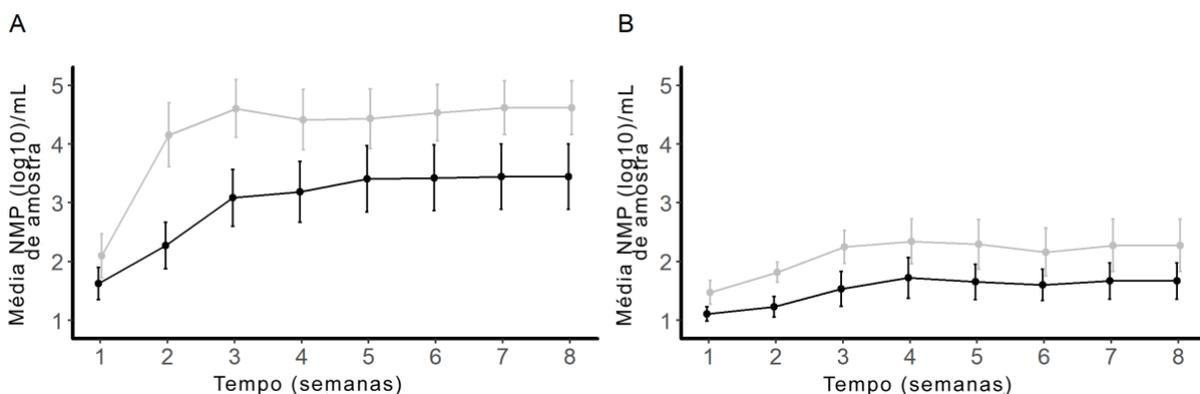


Figura 2. Leitura semanal das placas de 48 poços do Ensaio de Diluição das amostras de escarro antes e durante o tratamento antituberculose.

**Linha e pontos em cinza* representam a curva de crescimento semanal de amostras após adição de filtrado de cultura e *linha e pontos em preto* representam a curva de crescimento semanal de amostras sem a adição de filtrado de cultura. (A) amostra antes do tratamento (M0) e (B) amostras após um mês de tratamento (M1).

5.4 ENSAIO DE DILUIÇÃO LIMITANTE (DLM) COM CÁLCULO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

Todas as amostras foram cultivadas em placas de 48 poços contendo 7H9 suplementados ou não com FC para o ensaio de LDM (7H9 e 7H9+FC) e os resultados estão apresentados na Tabela 3. Em nenhuma dos meios de cultura convencionais que foram inoculadas amostras de escarro dos pacientes acompanhados, observou-se crescimento de MTB, entretanto foi possível observar crescimento de MTB em meio de cultura líquido suplementado com FC realizados após a inoculação de escarro de dois pacientes após o segundo mês de tratamento. Na Tabela 3, a porcentagem de bacilos ressuscitáveis (%BR) foi calculada utilizando o

número absolutos pela seguinte fórmula: %BR = UFC/NPM+FC x100. A contagem de UFC foi utilizada na fórmula por ter demonstrado melhor detecção de bacilo do que o meio líquido utilizado na placa de 48 poços para cálculo de NPM sem adição de filtrado de cultura (7H9).

Tabela 2. Resultados de culturas das amostras de escarro coletadas mensalmente dos 17 pacientes acompanhados durante o tratamento anti-TB. Os pacientes foram organizados em grupos de acordo com os resultados microbiológicos.

Grupo	Paciente	Mês de coleta do escarro	log ₁₀ UFC	log ₁₀ NMP	log ₁₀ NPM+FC	TR [#]	%BR ^{\$}
Grupo 1	12	M0	6,48	5,36	7,18	0,70	80,00
		M1	2,56	2,76	5,23	2,67	99,79
		M2	0,00	0,00	0,00	0,00	-
	15	M0	6,40	6,33	6,88	0,48	66,67
		M1	2,78	3,26	4,26	1,48	96,67
		M2	0,00	0,00	0,00	0,00	-
	10	M0	6,34	1,26	6,34	0,00	-
		M1	1,10	1,24	4,24	3,14	99,93
		M2	0,00	0,00	0,00	0,00	-
	5	M0	6,06	4,41	6,08	0,03	5,88
		M1	0,00	1,08	2,33	2,33	100,00
		M2*	0,00	0,00	1,26	1,26	100,00
	1	M0	5,63	1,36	5,95	0,32	52,22
		M1	0,00	0,60	1,56	1,56	100,00
		M2	0,00	0,00	0,00	0,00	-
	8	M0	4,90	5,09	5,09	0,19	34,78
		M1	0,00	0,67	1,34	1,34	100,00
		M2*	0,00	0,00	0,33	0,33	100,00
	3	M0	4,28	3,96	4,48	0,20	36,67
		M1	0,00	0,78	2,14	2,14	100,00
		M2	0,00	0,00	0,00	0,00	-
6	M0	4,15	3,87	4,15	0,00	-	
	M1	0,00	0,00	0,45	0,45	100,00	
	M2	0,00	0,00	0,00	0,00	-	
2	M0	2,83	1,38	2,92	0,09	19,18	

		M1	2,02	1,15	2,42	0,41	60,90	
		M2	0,00	1,45	1,78	1,78	100,00	
	17	M0	2,54	4,13	3,85	1,31	95,07	
		M1	0,00	0,00	0,15	0,15	100,00	
		M2	0,00	0,00	0,00	0,00	-	
Grupo 2	7	M0	5,85	6,13	6,13	0,29	48,15	
		M1	0,00	0,00	0,00	0,00	-	
	9	M0	4,65	4,65	4,65	0,00	-	
		M1	0,00	0,00	0,00	0,00	-	
	13	M0	3,18	3,64	3,64	0,46	65,28	
		M1	0,00	0,00	0,00	0,00	-	
	4	M0	2,52	2,18	3,19	0,66	78,28	
		M1	0,00	0,00	0,00	0,00	-	
	11	M0	2,40	0,26	2,65	0,26	44,44	
		M1	0,00	0,00	0,00	0,00	-	
	Grupo 3	16	M0	0,00	0,00	4,04	4,04	100,00
			M1	0,00	0,00	1,75	1,75	100,00
14		M0	0,00	1,41	2,40	2,40	100,00	
		M1	0,00	0,00	0,00	0,00	-	

*Pacientes que demonstraram crescimento de MTB somente após adição de FC na cultura da amostra M2, que foram avaliados clínica e laboratorialmente em relação à recidiva com coleta e análise de amostra de escarro M8 (coletada dois meses após o término do tratamento).

UCF = Unidade Formadora de Colônia; NPM = Número Mais Provável; FC = Filtrado de cultura; TR = taxa de ressuscitação.

$p=0.0085$; § $p=0.0080$, Wilcoxon Signed-Rank test.

Para avaliar a correlação entre a diminuição na carga bacilar das amostras de escarro coletadas antes e após o tratamento, foi realizada uma correlação linear, comparando a redução de crescimento micobacteriano entre M0 e M1 nos dois meios utilizados (7H9 e 7H9+FC). Os resultados dos 17 pacientes apresentados na Figura 3 indicam uma fraca correlação entre a redução das subpopulações dependente e independente de FC ($R^2 = 0.367$) (Figura 3A). O mesmo ajuste foi aplicado aos resultados dos pacientes dos grupos 1 e 2 (Figura 3B e 3C), o qual indicou uma forte correlação entre a redução das subpopulações

dependente e independente de FC somente no grupo 2 ($R^2 = 0.978$). A avaliação do grupo 1 também apresentou uma fraca correlação linear ($R^2=0.365$). A correlação linear não foi realizada nos pacientes do grupo 3 devido ao número reduzido de pacientes. Na Figura 3, a redução em UFC e NPM+FC foi calculada como a razão de log10 das amostras pré-tratamento e após 1 mês de tratamento (M0 e M1, respectivamente).

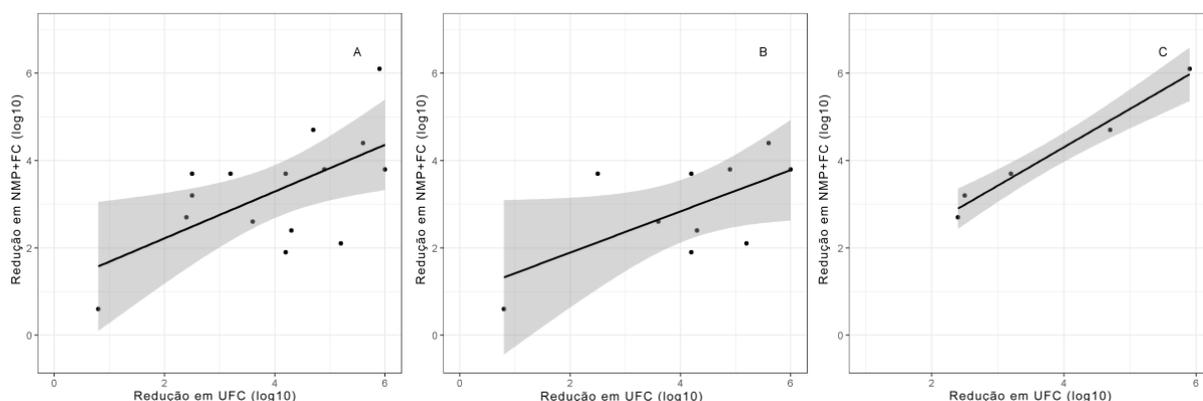


Figura 3. Correlação entre a redução das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em relação à subpopulação de MTB dependente de FC (NPM+FC) no primeiro mês de tratamento: (A) Todos os pacientes; (B) Grupo 1; (C) Grupo 2.

*As áreas em cinza representam o intervalo de confiança de 95%.

Foi calculada a taxa de ressuscitação (TR) para realizar o acompanhamento da ressuscitação induzida pela adição de FC em meio de cultura líquida. O cálculo foi feito através da fórmula: $TR = UFC - NPM+FC$. Além disso, foi calculada a porcentagem de bacilos ressuscitáveis (%BR) para avaliar o efeito da adição de FC em meio de cultura no ensaio de DLM, como descrito anteriormente (MUKAMOLOVA *et al.*, 2010), dividindo NPM+FC pela quantidade de UFC, em log10. A contagem de UFC foi utilizada na fórmula por ter demonstrado melhor isolamento de bacilo do que o meio líquido utilizado na placa de 48 poços para cálculo de NPM sem adição de filtrado de cultura. Foi utilizada uma outra forma de avaliar a porcentagem de bacilos ressuscitáveis das amostras de escarro dos pacientes com TB pulmonar utilizando a fórmula $\%BR = (UFC/NPM+FC) \times 100$. A

população dependente de FC aumentou proporcionalmente no grupo 1 (de uma média de 39% para 95,8%, $p=0,0080$) durante os primeiros dois meses de tratamento, embora nenhum paciente tenha demonstrado crescimento de MTB nas amostras de escarro coletadas após 3 meses de tratamento. Os resultados dessas análises estão apresentados na Tabela 3.

5.5 HIGIENIZAÇÃO ORAL COM GLUCONATO DE CLOREXIDINA 0,12%

A importância da higienização oral com clorexidina foi demonstrado em estudo anterior que relatou uma redução significativa da contaminação de culturas (PERES *et al.*, 2011), por isso realizamos uma avaliação do uso de CHX para reduzir as perdas de resultado por contaminação de culturas. Entretanto, devido à dificuldade em retornar ao CPC em dias consecutivos para a coleta das duas amostras pareadas, sete pacientes não foram incluídos nesta parte da análise do procedimento de higienização oral com clorexidina. Portanto, foi coletado um total de 44 amostras de escarro provenientes de 10 pacientes (22 pares) com tuberculose pulmonar confirmada por teste molecular Xpert MTB/RIF. As amostras foram coletadas em pontos diferentes durante o tratamento, de acordo com a disponibilidade do paciente.

A taxa de contaminação em todos os meios de cultura utilizados no estudo foi menor após a realização de protocolo de higienização oral com CHX, quando comparada à taxa de contaminação das culturas realizadas após higienização com protocolo padrão utilizando água (Tabela 2). Para avaliar o efeito do uso do protocolo de higienização oral com CHX no isolamento de MTB de amostras de escarro, foi realizado um teste comparativo nos pares de amostras com crescimento de MTB sem contaminação. Nos dois meios de cultura avaliados (7H9 e 7H9+FC), o isolamento de MTB foi ligeiramente menor após o protocolo que utiliza CHX em relação ao protocolo padrão, entretanto este efeito não foi estatisticamente significativo ($p>0,05$). Ademais, foi calculada a diferença de crescimento de MTB nas

culturas realizadas após os dois protocolos, representada por $\Delta(P-C)$ (Tabela 2), em que também não foi evidenciada diferença entre as mesmas.

Tabela 3. Avaliação da frequência de contaminação das culturas utilizando dois métodos distintos de higienização oral: água (padrão) *versus* gluconato de clorexidina 0,12%.

Meio	CHX (n=22)	Padrão (n=22)	p^\dagger	OR (IC95)*	p^\ddagger
O-K	5 (23%)	12 (55%)	0.023	1	
MGIT	2 (9%)	14 (64%)	0.003	0.86 (0.29-2.54)	0.782
7H9	1 (5%)	5 (23%)	0.131	0.15 (0.04-0.53)	0.003
7H9+FC	2 (9%)	7 (31%)	0.027	1.00 (0.34-2.95)	1.000

O-K = Ogawa-Kudoh ; FC = filtrado de cultura ; CHX = gluconato de clorexidina 0,12% ; *OR = *odds ration* – regressão

logística linear utilizando meio O-K como referência; IC95 = intervalo de confiança.

p^\dagger = McNemar ; p^\ddagger = regressão condicional.

6. DISCUSSÃO

Foi realizado um acompanhamento de 17 pacientes com tuberculose pulmonar durante o tratamento anti-TB para avaliar seu efeito sobre as diferentes subpopulações de MTB, além do efeito da adição de CF em meio de cultura líquido na melhora da detecção de bacilos presentes em amostras de escarro. Por intermédio da avaliação dos dados clínicos e demográficos foi possível verificar que a população desse estudo consistiu de um grupo homogêneo, com tuberculose pulmonar classificada radiograficamente como moderadamente avançada ou avançada. Estes resultados são atribuídos especialmente à presença de cavitações em todos os pacientes.

Apesar de não constituir um dos objetivos principais, a avaliação da taxa de contaminação de culturas realizadas após procedimento de higienização oral com CHX foi de grande importância para a condução do estudo, pois as taxas de contaminação de culturas realizadas a partir de amostras de escarro coletadas durante o tratamento tendem a ser maiores por conta da seleção de microrganismos mais resistentes da microbiota oral. Os resultados da Tabela 2 indicam uma redução nas taxas de contaminação das culturas após procedimento de higienização oral com CHX, principalmente porque o digluconato de clorexidina possui ação sob bactérias (DONNEL, 1999) porém não possui atividade micobactericida nem mesmo após 24h de exposição (RIKIMARU *et al.*, 2000). Este efeito positivo na redução da contaminação de culturas utilizadas para o isolamento de MTB foi previamente observado por Peres e colaboradores (2011), que relataram uma redução de 12% na contaminação de MGIT após higienização oral com CHX (PERES *et al.*, 2011).

Como este estudo utilizou amostras de escarro de pacientes em tratamento, caracterizados por serem portadores de bactérias mais resistentes, pois são expostos diariamente a uma concentração máxima de antibióticos por seis meses, era esperado que a taxa de contaminação

fosse maior do que o convencional (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008). De fato, a taxa de contaminação do MGIT de amostras de escarro sem prévia higienização oral com CHX foi de 64%, similar ao obtido em meio sólido (Ogawa-Kudoh (55%). O protocolo simples de higienização oral com CHX reduziu a contaminação de todas as culturas utilizadas para o diagnóstico de TB, tanto os meios convencionais, como o 7H9 suplementado com FC (Tabela 2), sendo que para o meio de cultura líquido adicionado de FC a redução foi de 22%. Essa redução da taxa de contaminação é atribuída principalmente à rápida ação da CHX sobre diversos tipos de bactéria, gerando lesão em ambas as membranas externa e interna, com início da ação bactericida em aproximadamente 20 segundos (DONNELL, 1999). É importante salientar que as micobactérias são altamente resistentes à ação de diversos compostos utilizados como antissépticos e desinfetantes, inclusive o digluconato de clorexidina (BEST *et al.*, 1990).

Conforme relatado anteriormente, as proteínas rpf secretadas em meio de cultura líquida pelo MTB podem agir diretamente em diversas fases da replicação micobacteriana com propriedades catalíticas com potencial de utilização na redução do tempo de positividade (TDP) de culturas. Neste estudo, constatou-se que o uso de FC constitui uma excelente abordagem para a redução de TDP de culturas, pois foi observado um aumento da carga bacilar em culturas realizadas a partir de amostras coletadas antes e durante o tratamento anti-TB (30% em M0; $p=0.0005$ e 35% em M1; $p=0.0977$, respectivamente). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa em culturas realizadas a partir de amostras M1, provavelmente devido à pequena diferença nos números absolutos obtidos no ensaio de LDM (NPM e NPM+FC). Esta abordagem foi previamente avaliada por outros autores utilizando o sistema de detecção de crescimento MGIT, com resultados promissores em relação à redução do TDP somente em amostras de escarro coletadas durante o tratamento (KOLWIJCK *et al.*, 2014). Um outro estudo realizado utilizando rpfB e rpfE recombinantes em meio de cultura

líquido demonstrou uma redução do TDP de culturas realizadas com amostras de escarro coletadas antes do início do tratamento (HUANG *et al.*, 2014).

As amostras de escarro de pacientes com TB pulmonar possuem uma grande variedade de MTB em estados metabólicos diferentes, que respondem a diversos fatores contidos no FC (CHENGALROYEN *et al.*, 2016). Portanto, o uso de rpf na sua forma recombinante é insuficiente, pois estaria subestimando o crescimento de subpopulações de MTB independentes de rpf. Dessa forma, os resultados desta tese reforçam que o FC deve ser utilizado para estimular o crescimento de subpopulações de MTB em diferentes estados metabólicos, principalmente porque é fácil de ser produzido e pode ser armazenado em -80°C por até seis meses sem perda de atividade (TURAPOV *et al.*, 2016).

Desde a descoberta das subpopulações dependentes dos componentes de FC em amostras de escarro de pacientes com TB pulmonar, muito se tem especulado sobre a dinâmica desses microrganismos durante o tratamento, principalmente devido às características de maior tolerância das subpopulações (SARATHY *et al.*, 2018). Este estudo prospectivo indicou que uma quantidade inicial baixa de MTB dependente de FC em amostras pré-tratamento é crucial para a efetividade do tratamento, já que não foi possível isolar MTB em culturas realizadas de amostras de escarro coletadas após o segundo mês de tratamento. Além disso, todos os pacientes foram considerados clinicamente curados no final do estudo. Os dados apresentados nesse estudo revelam que em um grupo de pacientes bem controlados, com boa aderência ao tratamento, as subpopulações de MTB se tornam indetectáveis pelo ensaio de LDM com FC após o segundo mês de tratamento. Os resultados obtidos diferem da nossa hipótese inicial, pois em um estudo anterior foi relatado crescimento de MTB dependente de FC em culturas de amostras de escarro após o quarto mês de tratamento (MUKAMOLOVA *et al.*, 2010). Entretanto, os autores não disponibilizaram dados sobre o acompanhamento dos pacientes e sua classificação quanto à gravidade e extensão radiográfica da doença. Igualmente

importante é que os pacientes que apresentaram crescimento de MTB após o quarto mês de tratamento exibiram um resultado de baciloscopia positiva, subpopulação que pode ser representada por bacilos metabolicamente ativos que não crescem em meio de cultura sólido a base de ágar. Os pacientes do nosso estudo foram classificados como moderadamente avançados e avançados de acordo com as características clínicas e radiográficas, o que pode explicar as menores populações de MTB dormentes nas amostras antes do início do tratamento, em relação ao mesmo estudo conduzido por Mukamolova e colaboradores (2010).

Uma explicação para a diferença entre a quantidade de MTB isolado nos dois estudos está relacionado à produção de grandes quantidades de rpf pelo MTB em ambiente replicativo, característico de indivíduos com características radiológicas e clínicas como as encontradas no nosso estudo. O resultado é a reativação de bacilos dormentes naquele microambiente pulmonar (GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012).

Em nossas análises, em três dos 17 pacientes foi observado crescimento de MTB dependente de FC apenas nas amostras de escarro M2, sendo que dois deles foram acompanhados em relação à recidiva da doença por meio da coleta de amostra de escarro M8 (dois meses após o final do tratamento). Ambos foram avaliados clínica e microbiologicamente sem qualquer indicação de recidiva. Entretanto, sugerimos o acompanhamento de um número maior de pacientes com essas mesmas características microbiológicas para que o real significado do encontro de MTB dependente de FC em culturas realizadas a partir de escarro nas fases tardias do tratamento seja melhor avaliado, principalmente porque essa detecção pode indicar recidiva e/ou emergência de resistência, representando uma valiosa fonte de pesquisas futuras.

Foi proposto por outros autores que a quantidade de MTB dependente de FC diminui mais lentamente nas amostras de escarro em relação à subpopulação metabolicamente ativa no decorrer do tratamento anti-TB. Ao avaliar a correlação linear entre a redução das

subpopulações que crescem em meio sólido (UFC) e a subpopulação dependente de FC (NPM+FC) no primeiro mês de tratamento, os resultados foram similares aos obtidos em estudo anterior, de acordo com o valor de $R^2 = 0,367$ (Figura 3A). Isto indica que os bacilos da MTB dependentes de FC são mais tolerantes ao tratamento, muito embora os resultados do estudo anterior tenham reportado o comparativo de crescimento de MTB em apenas 7-11 dias de tratamento (MUKAMOLOVA *et al.*, 2010). Esses resultados sugerem que: 1) o tratamento é menos efetivo sobre essa subpopulação e induz dormência (SARATHY *et al.*, 2018; TURAPOV *et al.*, 2014a) e; 2) fatores específicos do hospedeiro estão envolvidos na mudança de estado metabólico do MTB para dormente (TURAPOV *et al.*, 2014b).

Embora alguns dos nossos pacientes tenham demonstrado desfechos microbiológicos distintos, a maioria seguiu o mesmo padrão em relação à dinâmica durante o tratamento anti-TB. Este resultado é diferente do esperado, em que o crescimento de MTB dependente de FC ocorreria apenas nas fases tardias de tratamento, especialmente em pacientes com maioria da população total de MTB constituída da subpopulação de bacilos dormentes, dependentes de FC. No entanto, os resultados dos pacientes do grupo 3 indicam que fatores individuais podem direcionar a resposta ao tratamento, já que independente da carga bacilar inicial no escarro, houve conversão de cultura nas amostras M1.

Outra evidência da complexidade da suscetibilidade do MTB e a resposta do hospedeiro ao tratamento foi relatada recentemente em um experimento *ex vivo* com MTB persistentes provenientes de lesões caseosas. Tal estudo revelou que MTB neste microambiente é altamente tolerante às drogas do tratamento anti-TB (SARATHY *et al.*, 2018). Em conjunto, esses dados sugerem que não somente os ensaios *in vitro* devem ser realizados para avaliar a efetividade de novas abordagens terapêuticas sobre MTB persistente, mas um acompanhamento mais amplo dos pacientes é essencial para avaliar o efeito dessas terapias,

levando em consideração também os fatores imunológicos e fisiológicos do hospedeiro (ROSSER *et al.*, 2017) .

7. CONCLUSÃO

- a. O uso de filtrado de cultura líquida de MTB aumentou a carga bacilar em meios de cultura líquido.
- b. A subpopulação de MTB dependente de FC mostrou-se mais tolerante ao tratamento anti-TB, e portanto tem uma redução menos proeminente nas amostras de escarro em relação à subpopulação metabolicamente ativa.
- c. O uso de procedimento de higienização oral com CHX revelou-se uma excelente ferramenta para superar problemas de contaminação de culturas, especialmente daquelas realizadas a partir de amostras coletadas durante o tratamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUCHIN, A. M.; MULYUKIN, A. L.; SUZINA, N. E.; DUDA, V. I.; EL-REGISTAN, G. I.; KAPRELYANTS, A. S. (2009). Dormant forms of *Mycobacterium smegmatis* with distinct morphology. **Microbiology**, v. 155, n. 4, p. 1071–1079.
- BALD, D.; KOUL, A. (2010). Respiratory ATP synthesis: The new generation of mycobacterial drug targets? **FEMS Microbiology Letters**, v. 308, n. 1, p. 1–7.
- BEST, M.; SATTAR, S. A.; SPRINGTHORPE, V. S.; KENNEDY, M. E. (1990). Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. v. 28, n. 10, p. 2234–2239.
- BETTS, J. C.; LUKEY, P. T.; ROBB, L. C.; McADAM, R. A.; DUNCAN, K. (2002). Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 717–731.
- BIKETOV, S.; MUKAMOLOVA, G. V.; POTAPOV, V.; GILENKOV, E.; VOSTROKNUTOVA, G.; KELL, D. B.; YOUNG, M.; KAPRELYANTS, A. S. (2000). Culturability of *Mycobacterium tuberculosis* cells isolated from murine macrophages: a bacterial growth factor promotes recovery. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 233–240.
- CAMPOS, H. S. (2006). Diagnóstico da tuberculose. **Revista PULMÃO RJ – Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v. 15, n. 2, p. 92–99.
- CAÑO-MUÑIZ, S.; ANTHONY, R.; NIEMANN, S.; ALFFENAAR, J.-W. C. (2018). New approaches and therapeutic options for *Mycobacterium tuberculosis* in a dormant state. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 1–13.
- CARDONA, P. J. (2010). Revisiting the natural history of tuberculosis: the inclusion of constant reinfection, host tolerance, and damage-response frameworks leads to a better understanding of latent infection and its evolution towards active disease. **Archivum**

Immunologiae et Therapiae Experimentalis, v. 58, n. 1, p. 7–14.

CHAO, M. C.; RUBIN, E. J. (2010). Letting sleeping *dos* lie: Does dormancy play a role in tuberculosis? **Annual Review of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 293–311.

CHENGALROYEN, M. D.; BEUKES, G. M.; GORDHAN, B. G.; STREICHER, E. M.; CHURCHYARD, G.; HAFNER, R.; WARREN, R.; OTWOMBE, K.; MARTINSON, N.; KANA, B. D. (2016). Detection and quantification of differentially culturable tubercle bacteria in sputum from tuberculosis patients. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, p. 1–40.

CHIEN, H. P.; YU, M. C.; WU, M. H.; LIN, T. P.; LUH, K. T. (2000). Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, n. 9, p. 866–870.

CHURCHYARD, G.; KIM, P.; SHAH, N. S.; RUSTOMJEE, R.; GANDHI, N.; MATHEMA, B.; DOWDY, D.; KASMAR, A.; CARDENAS, V. (2017). What we know about tuberculosis transmission: an overview. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Suppl 6, p. S629–S635.

DEB, C., LEE, C.M., DUBEY, V.S., DANIEL, J., ABOMOELAK, B., SIRAKOVA, T.D., PAWAR, S., ROGERS, L., KOLATTUKUDY, P.E. (2009). A novel in vitro multiple-stress dormancy model for mycobacterium tuberculosis generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6.

DING, L.; YOKOTA, A. (2010). *Curvibacter fontana* sp. nov., a microaerobic bacteria isolated from well water. **The Journal of General and Applied Microbiology**, 56(3):267-271.

DONNELL, G. M. C.; RUSSELL, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants : Activity, dction, and resistance. v. 12, n. 1, p. 147–179.

DORMAN, S. E.; SCHUMACHER, S. G.; ALLAND, D.; NABETA, P.; ARMSTRONG, D.

T.; KING, B.; HALL, S. L.; CHAKRAVORTY, S.; CIRILLO, D. M.; TUKVADZE, N.; BABLISHVILI, N.; STEVENS, W.; SCOTT, L.; RODRIGUES, C.; KAZI, M. I.; JOLOBA, M.; NAKIYINGI, L.; NICOL, M. P.; GHEBREKRISTOS, Y.; ANYANGO, I.; MURITHI, W.; DIETZE, R.; PERES, R. L.; SKRAHINA, A.; AUCHYNKA, V.; CHOPRA, K. K.; HANIF, M.; LIU, X.; YUAN, X.; BOEHME, C. C.; ELLNER, J. J.; DENKINGER, C. M. (2017). Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 76–84.

DOWNING, K. J.; BETTS, J. C.; YOUNG, D. I.; McADAM, R. A.; KELLY, F.; YOUNG, M.; MIZRAHI, V. (2004). Global expression profiling of strains harbouring null mutations reveals that the five *rpf*-like genes of *Mycobacterium tuberculosis* show functional redundancy. **Tuberculosis**, v. 84, n. 3–4, p. 167–179.

DOWNING, K. J.; MISCHENKO, V. V.; SHLEEVA, M. O., YOUNG, D. I.; YOUNG, M.; KAPRELYANTS, A. S.; APT, A. S.; MIZRAHI, V. (2005). Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five *rpf*-like genes are defective for growth *in vivo* and for resuscitation *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 5, p. 3038–3043.

DUTTA, N. K.; KARAKOUSIS, P. C. (2014). Latent Tuberculosis Infection: Myths, Models, and Molecular Mechanisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, p. 343–371.

DWORKIN, J.; SHAH, I. M. (2010). Exit from dormancy in microbial organisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 890–896.

EHLERS, S. (2009). Lazy, dynamic or minimally recrudescence? on the elusive nature and location of the mycobacterium responsible for latent tuberculosis. **Infection**, v. 37, n. 2, p. 87–95.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. (2001). Immunology of Tuberculosis. **Annual Review of**

Immunology, v. 19, p. 93–129.

FRIEDEN, T. R.; SBARBARO, J. A. (2007). Promoting adherence to treatment for tuberculosis: the importance of direct observation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 85, n. 5, p. 407–409.

FURIN, J. J.; JOHNSON, J. L. (2005). Recent advances in the diagnosis and management of tuberculosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 11, n. 3, p. 189–194.

GAVRISH, E.; SIT, C. S.; CAO, S.; KANDROR, O.; SPOERING, A.; PEOPLES, A.; LING, L.; FETTERMAN, A.; HUGHES, D.; BISSELL, A.; TORREY, H.; AKOPIAN, T.; MUELLER, A.; EPSTEIN, S.; GOLDBERG, A.; CLARDY, J.; LEWIS, K. (2014). Lassomycin, a ribosomally synthesized cyclic peptide, kills mycobacterium tuberculosis by targeting the ATP-dependent protease ClpC1P1P2. **Chemistry and Biology**, v. 21, n. 4, p. 509–518.

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. E. (2012). *Mycobacterium tuberculosis*: Success through dormancy. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 514–532.

GOMPERTZ, B.(1825). On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new dode of determining the value of life contingencies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 115, p. 513–583.

GUPTA, R. K.; SRIVASTAVA, B. S.; SRIVASTAVA, R. (2010). Comparative expression analysis of rpf-like genes of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv under different physiological stress and growth conditions. **Microbiology**, v. 156, n. 9, p. 2714–2722.

HAAGSMA, A. C.; ABDILLAHI-IBRAHIM, R.; WAGNER, M. J.; KRAB, K.; VERGAUWEN, K.; GUILLEMONT, J.; ANDRIES, K.; LILL, H.; KOUL, A.; BALD, D. (2009). Selectivity of TMC207 towards Mycobacterial ATP synthase compared with that towards the eukaryotic homologue. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 1290–1292.

HEIFETS, L.; SANCHEZ, T. (2000). New agar medium for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1498–1501.

HERNÁNDEZ-PANDO, R.; JEYANATHAN, M.; MENGISTU, G.; AGUILAR, D.; OROZCO, H.; HARBOE, M.; ROOK, G. A. W.; BJUNE, G. (2000). Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. **Lancet**, v. 356, p. 2133–2138.

HETT, E. C.; CHAO, M. C.; STEYN, A. J.; FORTUNE, S. M.; DENG, L. L.; RUBIN, E. J. (2007). A partner for the resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 658–668.

HUANG, W.; QI, Y.; DIAO, Y.; YANG, F.; ZHA, X.; REN, C.; HUANG, D.; FRANKEN, K. L. M. C.; OTTENHOFF, T. H. M.; WU, Q.; SHEN, J. (2014). Use of resuscitation-promoting factor proteins improves the sensitivity of culture-based tuberculosis testing in special samples. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 189, n. 5, p. 612–614.

KANA, B.D.; GORDHAN, B.G.; DOWNING, K.J.; SUNG, N.; VOSTROKTUNOVA, G.; MACHOWSKI, E.E.; TSENOVA, L.; YOUNG, M.; KAPRELYANTS, A.; KAPLAN, G.; MIZRAHI, V. (2008). The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. v. 67, n. December 2007, p. 672–684.

KANA, B. D.; MIZRAHI, V. (2010). Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 39–50.

KAPRELYANTS, A. S.; MUKAMOLOVA, G. V.; RUGGIERO, A.; MAKAROV, V. A.; DEMINA, G. R.; SHLEEVA, M. O.; POTAPOV, V. D.; SHRAMKO, P. A. (2012).

Resuscitation-promoting factors (Rpf): in search of inhibitors. **Protein and Peptide Letters**, v. 19, n. 10, p. 1026–1034.

KAPRELYANTS, A. S.; GOTTSCHAL, J. C.; KELL, D. B. (1993). Dormancy in non-sporulating bacteria. **Microbiology Reviews**, v. 10, n. 3-4, p. 271–285.

KAUFMANN, S. H. E. (2010). Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, n. 4, p. 337–353.

KOLWIJCK, E.; FRIEDRICH, S. O.; KARINJA, M. N.; VAN INGEN, J.; WARREN, R. M.; DIACON, A. H. (2014). Early stationary phase culture supernatant accelerates growth of sputum cultures collected after initiation of anti-tuberculosis treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 7, p. O418–O420.

KONDRATIEVA, T.; AZHIKINA, T.; NIKONENKO, B.; KAPRELYANTS, A.; APT, A. (2014). Latent tuberculosis infection: What we know about its genetic control? **Tuberculosis**, v. 94, n. 5, p. 462–468.

KRUK, M. E.; SCHWALBE, N. R.; AGUIAR, C. A. (2008). Timing of default from tuberculosis treatment: A systematic review. **Tropical Medicine and International Health**, v. 13, n. 5, p. 703–712.

LANGLEY, I.; LIN, H.H.; EGWAGA, S.; DOULLA, B.; KU, C.C.; MURRAY, M.; COHEN, T.; SQUIRE, S.B. Assessment Of The Patient, Health System, And Population Effects Of Xpert Mtb/Rif And Alternative Diagnostics For Tuberculosis In Tanzania: An Integrated Modelling Approach. (2014). **Lancet Glob Health**, v. 2, n. 10, p.581-591.

LILLEBAEK, T.; DIRKSEN, A.; BAESS, I.; STRUNGE, B.; THOMSEN, V. Ø.; ANDERSEN, Å. B. (2002). Molecular evidence of endogenous reactivation of Mycobacterium tuberculosis after 33 years of latent infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 3, p. 401–404.

LORAINE, J.; PU, F.; TURAPOV, O.; MUKAMOLOVA, G. V. (2016). Development of an

in vitro assay for detection of drug-induced resuscitation-promoting-factor-dependent mycobacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6227–6233, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL (2008). **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculose.pdf.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL (2017). **Brasil Livre da Tuberculose: Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. [s.l.: s.n.]. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/brasil_livre_tuberculose_plano_nacional.pdf.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL (2019). **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil.pdf. Acesso em: 31/08/2019.

MITCHISON, D. A. (1985). The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. **Tubercle**, v. 66, n. 3, p. 219–225.

MUKAMOLOVA, G. V.; TURAPOV, O.; MALKIN, J.; WOLTMANN, G.; BARER, M. R. (2010). Resuscitation-promoting factors reveal an occult population of tubercle bacilli in sputum. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 181, n. 2, p. 174–180, 2010.

MUKAMOLOVA, G. V.; KAPRELYANTS, A. S.; YOUNG, D. I.; YOUNG, M.; KELL, D. B. (1998). A bacterial cytokine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 15, p. 8916–8921.

MUKAMOLOVA, G. V.; TURAPOV, O. A.; YOUNG, D. I.; KAPRELYANTS, A. S.; KELL, D. B.; YOUNG, M. (2002). A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium*

tuberculosis. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 623–635.

OLIVER, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. **The Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 93–100.

PANUTDAPORN, N.; KAWAMOTO, K.; ASAKURA, H.; MAKINO, S.-I. (2006). Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella* Typhimurium strain LT2. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 241–247.

PEDDIREDDY, V.; DODDAM, S. N.; AHMED, N. (2017). Mycobacterial dormancy systems and host responses in tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–19..

PERES, R. L.; PALACI, M.; LOUREIRO, R. B.; DIETZE, R.; JOHNSON, J. L.; GOLUB, J. E.; RUFFINO-NETTO, A.; MACIEL, E. L. (2011). Evaluation of oral antiseptic rinsing before sputum collection to reduce contamination of mycobacterial cultures, v. 49, n. 8, p. 3058–3060.

RIEDER, H.L. Risk of Travel-Associated Tuberculosis. (2001). **Clin Infect Dis**. v.33, n. 8, p.1393-1396.

RIKIMARU, T. KONDO, M. KONDO, S. OIZUMI, K. Efficacy Of Common Antiseptics Against Mycobacteria. (2000). **Int J Tuberc Lung Dis**, v.4, n.6, p.570–576.

ROSSER, A.; STOVER, C.; PAREEK, M.; MUKAMOLOV, G. V. (2017). Resuscitation-promoting factors are important determinants of the pathophysiology in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 621–630.

RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: A Calamidade Negligenciada. (2002). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 1, p. 51-58.

RUSSELL-GOLDMAN, E.; XU, J., WANG, X., CHAN, J., TUFARIELLO, J. M. (2008). A *Mycobacterium tuberculosis* Rpf double-knockout strain exhibits profound defects in

reactivation from chronic tuberculosis and innate immunity phenotypes. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4269–4281.

SARATHY, J. P.; VIA, L. E.; WEINER, D.; BLANC, L.; BOSHOFF, H.; EUGENIN, E. A.; BARRY, C. E.; DARTOISA, V. A. (2018). Extreme drug tolerance of *Mycobacterium tuberculosis* in Caseum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 2, p. e02266-17.

SIRICILLA, S.; MITACHI, K.; WAN, B.; FRANZBLAU, S. G.; KUROSU, M. (2014). Discovery of a capuramycin analog that kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* and its synergistic effects with translocase I inhibitors. **Journal of Antibiotics**, v. 68, n. 4, p. 271–278.

STEPHENSON, K.; LEWIS, R. J. (2005). Molecular insights into the initiation of sporulation in Gram-positive bacteria: New technologies for an old phenomenon. **Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 281–301.

SUDRE, P.; DAM, G.; KOCHI, A. (1992). Tuberculosis : a global overview of the situation today. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 70, n. 6, p. 149–159.

TURAPOV, O.; WADDELL, S. J., BURKE, B; GLENN, S.; SARYBAEVA, A. A.; TUDO, G., LABESSE, G.; YOUNG, D. I.; YOUNG, M.; ANDREW, P. W.; BUTCHER, P. D.; COHEN-GONSAUD, M.; MUKAMOLOVA, G. V. (2014a). Antimicrobial treatment improves mycobacterial survival in nonpermissive growth conditions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2798–2806.

TURAPOV, O.; GLENN, S.; KANA, B.; MAKAROV, V.; ANDREW, P. W.; MUKAMOLOVA, G. V. (2014b). The in vivo environment accelerates generation of resuscitation-promoting factor–dependent mycobacteria. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 190, n. 12, p. 1455–1457.

TURAPOV, O.; O'CONNOR, B. D.; SARYBAEVA, A. A.; WILLIAMS, C.; PATEL, H.;

- KADYROV, A. S.; SARYBAEV, A.S.; WOLTMANN, G.; BARER, M. R.; MUKAMOLOVA, G. V. (2016). Phenotypically adapted *Mycobacterium tuberculosis* populations from sputum are tolerant to first-line drugs. v. 60, n. 4, p. 2476–2483.
- KESHAVJEE, S.; FARMER, P. (2012). Tuberculosis, drug, resistance, and the history of modern medicine. v. 367, n. 10, p.931-936.
- ULRICHS, T.;KOSMIADI, G. A.; TRUSOV, V.; JÖRG, S.; PRADL, L.; TITUKHINA, M.; MISHENKO, V.; GUSHINA, N.; KAUFMANN, S. H. E. (2004). Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. **Journal of Pathology**, v. 204, n. 2, p. 217–228.
- VOSKUIL, M. I.; VISCONTI, K. C.; SCHOOLNIK, G. K. (2004). **Mycobacterium tuberculosis** gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. **Tuberculosis**, v. 84, n. 3–4, p. 218–227.
- WALLIS, R. S.;MAEURER, M.; MWABA, P.; CHAKAYA, J.; RUSTOMJEE, R.; MIGLIORI, G.B.; MARAIS, B.; SCHITO, M.; CHURCHYARD, G.; SWAMINATHAN, S.; HOELSCHER, M.; ZUMLA, A. (2016). Tuberculosis-advances in development of new drugs, treatment regimens, host-directed therapies, and biomarkers. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. e34–e46.
- WAYNE, L. G.; HAYES, L. G. (1996). An *in vitro* model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 2062–2069.
- WAYNE, L. G.; SOHASKEY, C. D. (2001). Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 139–163.
- WELLS, W. F. (1934). On air-borne infection: Study II. Droplets and droplet nuclei. **American Journal of Epidemiology**, v. 20, n. 3, p. 611–618.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010). Treatment of tuberculosis: guidelines, 4th ed.,

p. 160.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2014). WHO End TB Strategy. Disponível em: https://www.who.int/tb/End_TB_brochure.pdf?ua=1. Acesso em: 31/08/2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2018). Latent tuberculosis infection: Updated and consolidated guidelines for programmatic management, 1st ed., p. 74.

WHITELAW, A.; PETER, J.; SOHN, H.; VILJOEN, D.; THERON, G.; BADRI, M.; DAVIDS, V.; PAI, M.; DHEDA, K. Comparative cost and performance of light-emitting diode microscopy in HIV–tuberculosis-co-infected patients. (2011). **Eur Respir J**, v. 38, n.6, p.1393–1397.

XIE, Z.; SIDDIQI, N.; RUBIN, E. J. (2005). Differential antibiotic susceptibilities of starved *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 1–4.

ZHANG, Y. (2007). Advances in the treatment of tuberculosis. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 82, n. 5, p. 595–600.

ZUMLA, A.; RAVIGLIONE, M.; HAFNER, R.; M.D., VON REYN, F. (2013). Tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 8, p. 745–7553.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN 'T RIET, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881.

9. ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: **EFEITO DA TERAPIA ANTITUBERCULOSE SOBRE A SUB-POPULAÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis* DORMENTES E INFLUÊNCIA NA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR**

Centro de Pesquisa:

Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória
(Espírito Santo)

Investigadores:

Pedro Sousa de Almeida Júnior

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Avenida Marechal Campos, 1468

Bairro Santos Dumont – Vitória (Espírito Santo)

CEP: 29040-091

Fone: (27) 98174-7807

Moisés Palaci

Laboratório de Micobactérias/Núcleo de Doenças Infecciosas

Avenida Marechal Campos, 1468

Bairro Santos Dumont – Vitoria (Espírito Santo)

CEP: 29040-091

Fone: (27) 3335-7209

David Jamal Hadad

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Avenida Marechal Campos, 1468

Bairro Santos Dumont – Vitória (Espírito Santo)

CEP: 29040-091

Fone: (27) 99239-8929

Comitê de Ética em Pesquisa Local (CEP local):

Av. Marechal Campos, 1355, Bairro Santos Dumont, Vitória – ES

CEP: 29043-260

Email: cephucam@gmail.com

Fone: (27) 3335-7326

Nome do voluntário:

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa que tem como responsável o Prof. Moisés Palaci, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

O motivo de você estar sendo convidado a participar deste estudo é porque o seu médico suspeita que você pode ter tuberculose pulmonar, uma doença infectocontagiosa causada por uma bactéria (*Mycobacterium tuberculosis*) que passa de pessoa para outra através do ar ao falar, tossir ou espirrar.

O objetivo deste estudo é:

- a) Quantificar os bacilos vivos e em repouso (dormentes) presentes no escarro e a quantidade de bactérias que crescem em meio de cultura inoculado com o escarro coletado durante todo o tratamento.
- b) Avaliar o perfil de substâncias relacionadas com diferentes respostas do sistema imunológico (citocinas) e a indução ou não dos bacilos ao estado de repouso.

Para isto será necessário que você autorize a utilização de parte do escarro que você coletou espontaneamente ou sob indução com NaCl 3% para pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* e do sangue e da urina que serão coletados juntamente com a amostra de escarro. Estes exames serão processados no Laboratório de Micobactérias e Imunologia do Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES (NDI/UFES).

Você receberá orientações pelos profissionais do Centro de Pesquisa Clínica (CPC/NDI) sobre como eliminar espontaneamente o escarro.

Se você concordar em participar do estudo, você será informado sobre os resultados da PESQUISA DIRETA DE BACILOS ÁLCOOL-ÁCIDO RESISTENTES (ou BACILOSCOPIA), CULTURA para MICOBACTÉRIAS e do TESTE RÁPIDO MOLECULAR (TRM). Além disso, esses resultados serão registrados no seu prontuário médico.

Os microrganismos causadores da tuberculose que podem ser encontrados a partir da cultura do seu escarro serão guardados em freezer a -70°C no laboratório de micobactérias do NDI/UFES. Você tem o direito de concordar ou discordar desse procedimento.

Sua contribuição será muito importante para avaliarmos o efeito do tratamento antituberculose nas diferentes populações de bacilos (vivos e dormentes) presentes no escarro, além de nos ajudar a entender a participação do sistema imunológico no processo de indução à dormência.

Sua participação é voluntária, e a recusa em participar do estudo não implica em qualquer tipo de prejuízo para você.

Em **nenhum** momento será revelada sua identidade, garantindo o total anonimato e confidencialidade da sua identificação. Antes de assinar esse termo, você deve informar-se plenamente, não hesitando em formular perguntas sobre quaisquer aspectos que julgar conveniente.

1. O QUE VOCÊ DEVE SABER SOBRE ESTE ESTUDO:

- 1.1) Você está sendo convidado a participar deste projeto de pesquisa porque você apresenta sinais e sintomas compatíveis com tuberculose;
- 1.2) Este termo de consentimento explica o projeto de pesquisa e a sua participação no estudo;

- 1.3) Por favor, leia com cuidado e leve o tempo que for necessário;
- 1.4) Por favor, faça perguntas a qualquer momento sobre qualquer coisa que você não tenha entendido;
- 1.5) Você é um voluntário. Se você participar do projeto, poderá mudar de ideia depois. Você pode decidir não fazer parte mais do projeto e pode desistir a qualquer momento. Não haverá nenhuma penalidade ou perda de benefício se você decidir não participar ou desistir do estudo. Seus cuidados médicos não serão afetados;
- 1.6) Peça ao médico do estudo ou membro da equipe para te explicar qualquer palavra ou informação neste consentimento que você não entenda;
- 1.7) Se você participar desse estudo, você terá testes clínicos realizados como parte do estudo. Um registro será adicionado ao seu prontuário médico informando que você está participando desta pesquisa. Os resultados do TESTE RÁPIDO MOLECULAR, PESQUISA DIRETA DE BACILOS ÁLCOOL-ÁCIDO RESISTENTES (ou BACILOSCOPIA) e CULTURA PARA MICOBACTÉRIAS serão incluídos no seu histórico médico.

2. POR QUE ESTA PESQUISA ESTÁ SENDO FEITA?

- 2.1) Para descobrir os efeitos das drogas antituberculose sobre os bacilos causadores da tuberculose presentes nas amostras de escarro, tanto aqueles que estão ativos quanto aqueles que estão em um estado não-replicativo;
- 2.2) Podem participar deste estudo adultos com sintomas de tuberculose capazes de eliminar escarro espontaneamente ou de forma induzida e que concordem em

coletar amostras de sangue e urina para ensaios imunológicos e de verificação da adesão ao tratamento;

- 2.3) Caso você não consiga expectorar espontaneamente, seu escarro será coletado mediante indução com NaCl 3% utilizando nebulizador ultrassônico;
- 2.4) Será coletada uma amostra de escarro espontâneo ou induzido de cada paciente antes do tratamento e durante os 6 (seis) meses de tratamento antituberculose (uma amostra por mês);
- 2.5) Será coletada uma amostra de sangue de cada paciente durante os 6 (meses) de tratamento antituberculose (uma amostra por mês);
- 2.6) Será coletada uma amostra de urina de cada paciente durante os 6 (meses) de tratamento antituberculose (uma amostra por mês);

3. O QUE ACONTECERÁ SE VOCÊ PARTICIPAR DESSE ESTUDO?

- 3.1) Você deverá responder perguntas sobre a sua saúde e sobre qualquer remédio que você tenha recebido ou esteja recebendo;
- 3.2) Você autoriza que a equipe de estudo verifique seus registros médicos;
- 3.3) Você fornecerá no mínimo uma amostra de escarro espontâneo ou induzido ou, idealmente, três amostras de escarro (espontâneo ou induzido). Escarro é um material eliminado dos seus pulmões e vias aéreas. O escarro (espontâneo ou induzido) será utilizado para o **TESTE RÁPIDO MOLECULAR (TRM), PESQUISA DIRETA DE BACIOS ÁLCOOL-ÁCIDO RESISTENTES e CULTURA PARA MICOBACTÉRIAS.**

- 3.4) Você fornecerá uma amostra de urina ao fim dos 6 (seis) meses de tratamento. Essa amostra será utilizada para verificar se o tratamento está sendo feito adequadamente;
- 3.5) Você fornecerá uma amostra de sangue antes do tratamento e ao fim dos 6 (seis) meses de tratamento. Essa amostra será utilizada para a dosagem de substâncias (citocinas) que ajudarão a entender como seu sistema imunológico está agindo na doença;
- 3.6) Você será informado sobre os resultados de todos os exames realizados;
- 3.7) Você deverá submeter-se a uma radiografia de tórax.

4. QUAIS SÃO OS RISCOS OU DESCONFORTOS DESTES ESTUDOS?

Os riscos relacionados a esse estudo são mínimos.

- 4.1) Existem riscos relacionados ao Raio-X? A exposição à radiação neste estudo é de 0,0100 rem (um rem é uma unidade de radiação absorvida). Isso é menor que 0,3 rem que uma pessoa normal recebe a cada ano, no Brasil e nos Estados Unidos, proveniente de fontes naturais como o sol, espaço, ar, comida e solo. Portanto, o risco da exposição à radiação nesse estudo é muito pequena.
- 4.2) Existem riscos relacionados a gravidez? Não.
- 4.3) Existem riscos relacionados à coleta de sangue? Não, entretanto a coleta de sangue poderá causar pequena dor e um possível hematoma no local da punção. Algumas pessoas podem sentir fraqueza.
- 4.4) Existem riscos relacionados à coleta de urina? Não.

4.5) Existem benefícios em participar deste estudo? Os resultados dos exames laboratoriais serão fornecidos a você. Ao participar deste estudo, você também poderá ajudar outras pessoas portadoras de TB no futuro com o conhecimento que os cientistas vão adquirir com esta pesquisa.

4.6) A participação neste estudo terá algum custo para mim? Não.

4.7) Eu poderei abandonar o estudo antes do término do mesmo? Sim. Você pode concordar em participar do estudo agora e abandoná-lo a qualquer momento.

EM CASO DE DÚVIDAS ESTAMOS À DISPOSIÇÃO NO TELEFONE CELULAR: (27) 98174-7807.

_____ Eu concordo em participar do estudo. Eu concordo em ter a bactéria isolada do meu pulmão e reservada para uso em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética.

_____ Eu concordo em participar do estudo, mas eu NÃO CONCORDO em ter a bactéria isolada do meu pulmão e reservada para uso em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética.

_____ Eu NÃO concordo em participar do estudo. Porém, eu terei garantido os procedimentos de BACILOSCOPIA, CULTURA e IDENTIFICAÇÃO da CEPA de micobactéria isolada a partir da cultura do escarro coletado do meu pulmão.

Nome legível do participante da pesquisa

Assinatura do participante da pesquisa

Data

Nome legível da testemunha ou responsável

Assinatura da testemunha ou responsável

Data

ANEXO 2

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO E RAIOS-X

1. Identificação:

Número estudo: _____

Lab ID: _____

Data de Nascimento: ____/____/____

Idade: _____ Sexo: Masculino Feminino

2. Avaliação Clínica:

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

Tempo de evolução da doença: _____

Sinais e sintomas:

3. Raio-X de Tórax:

Raio-X foi realizado? Sim Não (razão): _____

Achados Radiográficos

Normal

Anormal: sem relação com TB (ex.: escoliose)

Anormal: possivelmente compatível com TB

Anormal: altamente sugestivo de TB

Desconhecido

- Caso alguma resposta “ANORMAL” tenha sido selecionada acima, preencha as questões abaixo:

Infiltrado? Sim → Se SIM: Unilateral Bilateral Desconhecido

- Quantos lobos envolvidos?

1 2 mais de 2 Desconhecido

Não

Desconhecido

Infiltrados miliares? Sim Não Desconhecido

Cavidade(s)? Sim Não Desconhecido

Extensão da doença pulmonar no Raio-X de tórax:

0 1 2 3

0 = Normal

1 = Doença mínima: infiltrações de densidade leve a moderada; a doença pode estar presente em pequena porção de ambos os pulmões; o volume total de infiltrações deve ser o volume de um pulmão, presente acima da segunda junção condroesternal e a espinha da quarta junção, ou o corpo da quinta vértebra torácica; nenhuma cavidade deve estar presente.

2 = Doença moderadamente avançada: a doença pode estar presente em um ou ambos os pulmões; a extensão total não deve ser mais do que o seguinte: (a) Lesões dispersas de densidade leve a moderada; não devem envolver mais do que o volume total de um pulmão ou o volume equivalente de ambos; (b) Lesões densas e confluentes; não devem envolver mais do que 1/3 do volume de um pulmão; (c) O diâmetro total da(s) cavidade(s) não deve ser maior do que 4 cm.

3 = Avançada: lesões mais extensas do que moderadamente avançada.

4. Consumo de Bebida Alcoólica:

Atualmente ingere bebida alcoólica?

Sim (Se sim, responda os itens abaixo)

Não

- **Se sim. Com que frequência ingere bebida alcoólica?**

Raramente (< 1 dia / semana)

Ocasionalmente (1 – 3 dias / semana)

Frequentemente (4 – 6 dias / semana)

Diariamente

Prefiro não responder

5. Tabagismo:

Sim

Não

Você fumou um cigarro – ainda que só uma tragada – nos últimos dias? _____

Se sim, quantos cigarros fuma, habitualmente, em um dia? _____

Quando fumou o seu último cigarro?

Há mais de dois anos.

Há mais de um ano.

Quatro a doze meses atrás.

Um a três meses atrás.

Nas últimas duas semanas.

Hoje.

6. Medicação:

Fez uso de medicamentos? Sim Não

Se sim, qual(is)?

—

Uso prévio de Antimicrobiano: _____ Há quanto tempo?

7. Doenças Respiratórias:

Asma

Rinite

Bronquite Crônica

DPOC

8. Agravos Associados

Câncer

Doença Renal

Diabetes

Abuso de Drogas

Outros:

ASSINATURA DO COLETOR: _____

DATA DO PREENCHIMENTO: _____