



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

MANUELA NEGRELLI BRUNETTI

**METODIZAÇÃO DO ISOLAMENTO E ANÁLISE DO PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DAS POPULAÇÕES
RESSUSCITÁVEIS E METABOLICAMENTE ATIVAS DE *Mycobacterium
tuberculosis***

VITÓRIA
2021

MANUELA NEGRELLI BRUNETTI

**METODIZAÇÃO DO ISOLAMENTO E ANÁLISE DO PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DAS POPULAÇÕES
RESSUSCITÁVEIS E METABOLICAMENTE ATIVAS DE *Mycobacterium
tuberculosis***

Dissertação 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 Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Moisés Palaci

Coorientador: Pedro Sousa de Almeida Júnior

**VITÓRIA
2021**

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

B895 m Brunetti, Manuela Negrelli, 1996-
Metodização do isolamento e análise do perfil de
susceptibilidade aos antimicrobianos das populações
ressuscitáveis e metabolicamente ativas de *Mycobacterium
tuberculosis* / Manuela Negrelli Brunetti. - 2021.
109 f. : il.

Orientador: Moises Palaci.

Coorientador: Pedro Sousa de Almeida Junior.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. I. Palaci, Moises. II.
Almeida Junior, Pedro Sousa de. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO

O(a) mestrando(a) Manuela Negrelli Brunetti apresentou a tese intitulada "Metodização do isolamento e análise do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das populações resuscitáveis e metabolicamente ativas de Mycobacterium tuberculosis" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu

(X) aprovar () reprovar a dissertação habilitando Manuela Negrelli Brunetti a obter o Grau de Mestre(a) em Doenças Infecciosas.

Vitória, 29 de Julho de 2021.

Prof. Dr. Moises Palaci

Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Profa. Dra. Lucilaine Ferrazoli

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Titular Externo

Profa. Dra. Kênia Valéria dos Santos

Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno

Manuela Negrelli Brunetti

Discentes



Centro de Ciências da Saúde – Av. Marechal Campos, 1468 - Bonfim, Vitória - ES | CEP 29047-105 Tel: (27) 3335-7504 |
www.doencasinfecciosas.ufes.br | ppgdi.ufes@gmail.com

*Aos meus pais, Márcia e Marcelo, que sempre
me apoiaram e incentivaram com o mais
sincero amor, tornando esse sonho possível.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por ser minha fonte de força e fé. Por ser meu guia e sustentação nos momentos difíceis e de insegurança. E por colocar pessoas excepcionais na minha vida e no meu caminho;

Aos meus queridos pais, Márcia e Marcelo, por serem os mais incríveis e maravilhosos que eu poderia ter ao meu lado. Por todo o amor, dedicação e cuidado me incentivando a cada passo. Vocês são minha maior inspiração;

À minha irmã, Marcela, pelas conversas, conselhos e momentos de descontração que foram fundamentais para seguir essa jornada;

Ao meu noivo Claudiomar, pelo companheirismo, paciência, apoio e carinho de sempre. Por estar sempre ao meu lado me ajudando a crescer e me incentivando a continuar;

Aos meus tios, Helena e Luiz, pelo acolhimento em sua casa durante todo esse período. Vocês tornaram essa jornada possível e me deram todo o carinho e incentivo;

Aos meus avós, Nice, Hemerson e Orlando (*in memoriam*) e Soneide, por constituírem minha incrível família por me incentivarem a estudar desde sempre;

À toda minha família, que sempre me encorajou e esteve comigo na realização desse sonho;

Ao Profs. Luciano Rodrigues e Adriene por serem minha inspiração e motivação, e por acreditarem no meu potencial desde o início, me guiando e me dando conselhos com muito carinho e dedicação;

Aos amigos que Deus colocou em minha vida durante esse período. Em especial Luiz Antonio Rangel, por me levar para visitar minha família aos fins de semana, sempre com muito cuidado e zelo, e com longas conversas presos no trânsito. Agradeço também à Mariana Ribeiro e sua mãe Dona Ana, pelas conversas e conselhos, além das tardes maravilhosas com tantas risadas;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Moises Palaci, por me dar a oportunidade de desenvolver esse estudo, confiança no meu trabalho e pela disponibilidade em ajudar sempre que precisava;

Ao meu coorientador, Pedro Sousa, por me ensinar as técnicas e por estar sempre disponível para me ajudar com as dúvidas e dificuldades do meu estudo;

Ao meu co-coorientador, Luiz Guilherme, por estar comigo a cada experimento, me ensinando com muita sabedoria e paciência, sempre muito dedicado e solícito;

À minha grande amiga Mariana Mourad, pela amizade incrível desde o início e pelo companheirismo dentro e fora do laboratório e à Gabriela Steffenoni, pelas longas conversas científicas descontraídas. Vocês tornaram a jornada mais alegre e suave.

Aos meus amigos do laboratório, João, Leduck, Gerson, Brunelli, Paola e Adeilton, pelos auxílios no desenvolvimento dos experimentos. E em especial à Solange Vinhas e Renata Lyrio, por estarem sempre disponíveis para ajudar com muita sabedoria e acolhimento;

Aos demais colegas de mestrado e do laboratório de Imunologia do NDI que estiveram comigo durante esse período e fizeram parte dessa conquista;

Ao Núcleo de Doença Infecciosas, por ser minha segunda casa, e aos laboratórios de Biotecnologia, ao Laboratório de Petroleômica e Química Forense e ao Laboratório Multiusuário da UFES, pela permissão no uso de seus equipamentos;

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dra. Kênia Valéria dos Santos e Prof. Dra. Lucilaine Ferrazoli, por terem aceitado o convite para minha defesa de dissertação;

Por fim, à CAPES pela bolsa concedida permitindo minha dedicação exclusiva à pesquisa e à FAPES pelo fomento para o desenvolvimento desse estudo.

“Venham a mim todos vocês que estão cansados e sobrecarregados, e eu lhes darei descanso. Tomem sobre vocês o meu jugo. Deixem que eu lhes ensine, pois sou manso e humilde de coração, e encontrarão descanso”

Mateus 11:28-30

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

BRUNETTI, M. N. **Metodização do isolamento e análise do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das populações resuscitáveis e metabolicamente ativas de *Mycobacterium tuberculosis***. Dissertação (Mestrado). Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2021. 109 p.

Uma terapia antimicrobiana eficaz constitui um dos maiores desafios no combate à Tuberculose (TB), visto que falhas terapêuticas podem acontecer por diversos motivos. O bacilo causador da doença pode ser encontrado em diversos estados metabólicos em amostras de escarro de pacientes com TB, sendo demonstrado que esses bacilos em estados dormentes são mais tolerantes a algumas drogas e não são visualizados pelos métodos convencionais de diagnóstico, podendo justificar eventuais falhas terapêuticas sem motivo aparente. Esse estudo se propôs a avaliar se o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos da população total (ressuscitável + ativa) de *Mycobacterium tuberculosis*, isolado de amostras de escarro de pacientes com TB pulmonar se difere do perfil da população metabolicamente ativa. O estudo foi dividido em duas etapas. A primeira consistiu na padronização da obtenção da população total de bacilos por meio da utilização de meio de cultura contendo sobrenadante de cultura líquida de MTB (SN), e da padronização do Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) pelo método de microdiluição em caldo. A segunda etapa testou os métodos padronizados para a obtenção da população total de bactérias utilizando amostras de escarro de pacientes com TB pulmonar e seguindo com a realização do TSA nessas amostras. Nossos resultados mostraram que o meio de cultura líquido 7H9 acrescido de SN foi superior aos demais testados com relação à recuperação de bacilos resuscitáveis e, com concentração bacteriana suficiente para a realização do TSA de forma direta. Porém, devido à alta taxa de contaminação desse meio, o método indireto foi empregado para a obtenção das populações de MTB, antes do TSA. A adição de SN ao meio de crescimento líquido 7H9, mostrou diminuir o tempo de positividade em até 1,5 dias. O uso da Densidade Óptica como ferramenta de detecção de crescimento em cultura líquida, mostrou-se ser inferior ao sistema automatizado, não possuindo correlação com o crescimento bacteriano. Adicionalmente, nossos resultados mostraram que a etapa de lavagem e o congelamento parece diminuir os fatores inibidores presentes no escarro, através

da diminuição da taxa de inibição de crescimento após o congelamento das amostras, porém, não elimina. O uso de SN mostrou, em testes com cepa de referência, que acelera o crescimento de MTB ativa, mas não altera a quantificação bacteriana pela técnica de Número Mais Provável (NMP). O TSA com a população total de bacilos embora apresente valores superiores de CIM em maior frequência não implica na alteração de sensibilidade e resistência na população de pacientes sem tratamento prévio para TB pulmonar. Apesar disso, nossos resultados sugerem que o perfil de suscetibilidade da população total de bacilos comparada à população ativa, do único caso de paciente em tratamento incluído nesse estudo, evidenciou padrões de sensibilidade/resistência possivelmente diferentes nessa população de pacientes, sugerindo a necessidade de novos estudos envolvendo pacientes em tratamento, com suspeita de resistência, falha terapêutica ou recidiva.

Palavras-chave: Tuberculose. *Mycobacterium tuberculosis*. Dormência. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos.

ABSTRACT

An effective antimicrobial therapy is one of the biggest challenges in combating Tuberculosis (TB), since therapeutic failures can happen for several reasons. The bacillus that causes the disease can be found in different metabolic states in sputum samples from patients with TB, and it has been demonstrated that these bacilli in dormant states are more tolerant to some drugs and are not visualized by conventional diagnostic methods, which may justify eventual therapeutic failures for no apparent reason. This study aimed to assess whether the antimicrobial susceptibility profile of the total population (resuscitable + active) of *Mycobacterium tuberculosis*, isolated from sputum samples from patients with pulmonary TB, differs from the profile of the metabolically active population. The study was divided into two stages. The first consisted of standardizing the obtainment of the total population of bacilli by using a culture medium with MTB liquid culture supernatant filtrate (SN), and standardizing the Antimicrobial Susceptibility Test (AST) by the broth microdilution method. The second stage tested standardized methods for obtaining the total bacterial population using sputum samples from patients with pulmonary TB and followed by performing AST on these samples. Our results showed that the 7H9 liquid culture medium added with SN was superior to the others tested in relation to the recovery of resuscitable bacilli and with sufficient bacterial concentration to carry out the AST directly. However, due to the high contamination rate of this medium, the indirect method was used to obtain MTB populations, before the AST. The addition of SN to the 7H9 liquid growth medium has been shown to decrease the positivity time by up to 1.5 days. The use of Optical Density as a growth detection tool in liquid culture was shown to be inferior to the automated system, not having any correlation with bacterial growth. Additionally, our results showed that the washing and freezing step seems to reduce the inhibitory factors present in the sputum, by decreasing the growth inhibition rate after freezing the samples, however, it does not eliminate them. The use of SN has shown, in tests with reference strain, that it accelerates the growth of active MTB, but does not alter bacterial quantification by the Most Probable Number (MPN) technique. The AST with the total population of bacilli, although presenting higher MIC values more frequently, does not imply changes in sensitivity and resistance in the population of patients without previous treatment for pulmonary TB. Nevertheless, our results suggest that the susceptibility profile of the total population of bacilli compared to the active

population, of the only case of a patient under treatment included in this study, showed possibly different sensitivity/resistance patterns in this population of patients, suggesting the need for new studies involving patients undergoing treatment with suspected resistance, therapeutic failure or relapse.

Keywords: Tuberculosis. *Mycobacterium tuberculosis*. Dormancy. Antimicrobial Susceptibility Test.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMK – Amicacina
ANOVA – Análise de Variância
ATCC – *American Type Culture Collection*
ATP – Adenosina Trifosfato
BDQ – Bedaquilina
BR – Bacilos Ressuscitáveis
CC – Concentração Crítica
CCS – Centro de Ciências da Saúde
CFZ – Clofazimina
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CMTB – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
CS – Cicloserina
CSB – Cabine de Segurança Biológica
DMSO – Dimetilsulfóxido
DO – Densidade Ótica
EMB – Etambutol
HIV – *Human Immunodeficiency Virus*
Hr-TB – Tuberculose Resistente à Isoniazida (do inglês *isoniazid-resistant TB*)
ILTB – Infecção Latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*
INH – Isoniazida
LFX – Levofloxacina
LJ – Lowenstein-Jensen
Log – Logaritmo
LPSN – *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*
LZD – Linezolida
MDK – *Minimum Duration for Killing*
MDR-TB – Tuberculose Multidroga resistente (do inglês *multidrug-resistant TB*)
MGIT – *Mycobacterial Growth Indicator Tube*
MODS – *Microscopic Observation Drug Susceptibility*
MTB – *Mycobacterium tuberculosis*
NALC – N-Acetil-L-Cisteína

NaOH – Hidróxido de Sódio

NDI – Núcleo de Doenças Infecciosas

NMP – Número Mais Provável

NMP_SN – Meio Middlebrook 7H9 + Sobrenadante

OADC – *Oleic Acid, Albumin, Dextrose, Catalase*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

pH – potencial hidrogeniônico

PZA – Pirazinamida

RIF – Rifampicina

RPF – *Ressuscitation Promoting Factor*

RRDR – *Rifampicin Resistance Determining Region*

RR-TB – Tuberculose Resistente à Rifampicina (do inglês *rifampicin-resistant TB*)

SM – Estreptomicina

SN – Sobrenadante de cultura líquida de MTB

TB – Tuberculose

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TG – Triacilglicerol

TI – Taxa de Inibição

TR – Taxa de Ressuscitação

TSA – Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

TTD – *Time to Detect*

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

WHO – *World Health Organization*

XDR-TB – Tuberculose Extensivamente Resistente (do inglês *extensively drug-resistant TB*)

ZN – Ziehl-Neelsen

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Incidência estimada de Tuberculose em 2019.....	26
Figura 2 – Classificação de países prioritários no combate à Tuberculose de 2016 a 2020.....	27
Figura 3 – Diferentes subpopulações de MTB presentes em uma amostra de escarro de paciente com tuberculose pulmonar.....	35
Figura 4 – Delineamento experimental do estudo.....	43
Figura 5 – Modelo esquemático do procedimento de diluição da amostra em placa de 48 poços para a realização da técnica de NMP.....	46
Figura 6 – Fluidificação das amostras com o sistema de agulha 23G.....	49
Figura 7 – Esquema da padronização do meio de cultura para obtenção da população total de MTB.....	50
Figura 8 – Modelo esquemático do método indireto.....	52
Figura 9 – Modelo esquemático da placa de TSA com 8 diluições.....	55
Figura 10 – Resultado da leitura após 8 semanas de incubação de uma das placas de 48 poços a partir de cepa H ₃₇ R _v	63
Figura 11 – Crescimento de MTB em diferentes concentrações de DMSO após 14 dias de incubação.....	71
Figura 12 – Resultados obtidos para 10 dias de crescimento de MTB em uma das placas de teste com 8 diluições.....	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Cálculo do UFC, NMP e NMP_SN das amostras e %BR.....	61
Gráfico 2 – NMP e NMP_SN calculados semanalmente a partir de cepa H ₃₇ R _v	63
Gráfico 3 – Cálculo do NMP antes e após a lavagem das amostras.....	64
Gráfico 4 – Cálculo do NMP antes e após o congelamento das amostras.....	65
Gráfico 5 – TTD médio para cada meio de cultura testado na padronização dos meios.....	66
Gráfico 6 – Relação dos valores médios da DO _{625nm} e de UFC/ml nas amostras durante os dias de incubação.....	67-68
Gráfico 7 – Evolução da %BR das amostras em crescimento.....	70
Gráfico 8 – Incremento da CIM dos antimicrobianos entre as populações total e ativa e MIC ₅₀ e MIC ₉₀	76-77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos grupos de antimicrobianos de segunda linha no tratamento de TB.....	28
Tabela 2 - Valores para H ₃₇ R _v e Concentrações Críticas dos antimicrobianos.....	54
Tabela 3 – Resultados de NMP, NMP_SN e UFC/ml em triplicata para H ₃₇ R _v	62
Tabela 4 – Valores obtidos para H ₃₇ R _v em triplicata para cada antimicrobiano em teste.....	72
Tabela 5 – Valores obtidos para H ₃₇ R _a para cada antimicrobiano em teste.....	73
Tabela 6 – Análise de concordância dos resultados da CIM de cada antimicrobiano entre as populações ativa e total dos 41 isolados.....	75
Tabela 7 – Média geométrica, teste Kappa e correlação da CIM das populações total e ativa para cada antimicrobiano.....	78
Tabela 8 – Resultados da CIM de cada antimicrobianos das populações total e metabolicamente ativa da amostra com isolado resistente.....	79

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO	25
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	25
2.3 TRATAMENTO	27
2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	29
2.4.1 Exame por microscopia direta	29
2.4.2 Cultura bacteriana	29
2.4.3 Xpert® MTB/RIF	30
2.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	31
2.5.1 Métodos genotípicos	31
2.5.2 Métodos fenotípicos	32
2.6 RESISTÊNCIA, PERSISTÊNCIA E DORMÊNCIA.....	34
2.6.1 Dormência e antibioticoterapia	36
2.7 FATOR PROMOTOR DE RESSUSCITAÇÃO	37
3. JUSTIFICATIVA	39
4. OBJETIVOS	41
4.1 OBJETIVO GERAL	41
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
5. MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	43
5.2 AMOSTRAS CLÍNICAS.....	44
5.2.1 Critérios de Inclusão	44

5.2.2 Critérios de Exclusão	44
5.3 CEPAS DE REFERÊNCIA	44
5.4 ANTIMICROBIANOS.....	44
5.5 PROCEDIMENTOS ESPECÍFICOS.....	45
5.5.1 Preparo do sobrenadante de cultura líquida de MTB	45
5.5.2 Cálculo do Número Mais Provável (NMP) e taxa de bacilos ressuscitáveis (%BR)	45
5.5.2.1 Influência do uso de SN no crescimento de MTB	47
5.5.3 Descontaminação, fluidificação e armazenamento das amostras	48
5.5.4 Teste de diminuição dos fatores inibidores presentes no escarro	49
5.5.5 Obtenção das populações total e metabolicamente ativa de MTB	50
5.5.5.1 Método direto.....	50
5.5.5.2 Método indireto	51
5.5.6 Exposição da amostra ao sobrenadante de cultura líquida de MTB ..	52
5.5.7 Padronização do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos pelo método de Microdiluição em Caldo	53
5.5.7.1 Preparo do inóculo.....	53
5.5.7.2 Teste de toxicidade do dimetilsulfóxido (DMSO)	54
5.5.7.3 Teste de ação da Pirazinamida em diferentes pHs	55
5.5.7.4 Modelo da placa de TSA	55
5.5.7.5 Teste com cepas H ₃₇ R _a e Resistentes à Rifampicina, Isoniazida e Estreptomicina.....	56
5.5.7.6 Comparação com o BACTEC™ MGIT™ 960 (padrão-ouro)	56
5.5.8 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos a partir das populações ativa e total	56
5.5.9 Testes com amostra de escarro contendo isolado de MTB resistente	57

6. RESULTADOS	61
6.1 CÁLCULO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL DAS POPULAÇÕES TOTAL E ATIVA DE MTB	61
6.1.1 Amostras de escarro.....	61
6.1.2 Influência do uso de SN no crescimento de MTB	62
6.2 DIMINUIÇÃO DOS FATORES INIBIDORES PRESENTES NO ESCARRO	64
6.2.1 Etapa de lavagem	64
6.2.2 Etapa de congelamento	65
6.3 OBTENÇÃO DA POPULAÇÃO TOTAL DE MTB.....	66
6.3.1 TTD (Time to Detect) para os diferentes meios	66
6.3.2 Densidade ótica (DO) e UFC/ml X Sistema BACTEC™ MGIT™ 960....	67
6.3.3 Determinação do melhor meio e método de ressuscitação e realização do TSA	68
6.3.4 Tempo mínimo de exposição da amostra ao sobrenadante de cultura líquida de MTB.....	69
6.4 PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA) PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	70
6.4.1 Toxicidade do dimetilsulfóxido (DMSO).....	70
6.4.2 Ação da Pirazinamida em diferentes pHs	71
6.4.3 Teste piloto com cepa H ₃₇ R _v	71
6.4.3.1 Modelo com 8 diluições de 10 antimicrobianos	71
6.4.4 Testes com cepas H ₃₇ R _a e Resistentes à Rifampicina, Isoniazida e Estreptomicina.	73
6.4.4.1 Comparação com o MGIT (padrão-ouro).....	74
6.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PARTIR DAS POPULAÇÕES TOTAL E ATIVA	74
6.6 AMOSTRA COM ISOLADO RESISTENTE DE PACIENTE EM TRATAMENTO	78

7 DISCUSSÃO	81
8. CONCLUSÃO	89
9. REFERÊNCIAS.....	92

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) foi considerada a maior causa de morte anual por um único agente infeccioso até o início da pandemia da Covid-19 e apresenta um grande desafio de saúde pública mundial (WHO, 2020). Sua incidência está relacionada a pobreza, imigração, escassez de recursos e problemas na saúde pública (BORGDORFF; VAN SOOLINGEN, 2013; LEUNG, 1999). Pessoas com HIV (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) apresentam maior probabilidade de adquirir a doença ativa, sendo a TB a maior causa de óbito de pessoas soropositivas (WHO, 2020).

É uma doença infecciosa causada por micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) sendo caracterizada, em aproximadamente 85% dos casos, por inflamação granulomatosa necrosante, na maioria das vezes apresentada nos pulmões (BAÑULS et al., 2015; DHEDA; BARRY; MAARTENS, 2015). MTB pode causar infecções extrapulmonares, principalmente em órgãos que têm alta tensão de oxigênio como córtex renal, o córtex cerebral, as extremidades de crescimento dos ossos longos, vértebras e adrenais (KAUFMANN, 2001).

A transmissão se dá quando um indivíduo infectado por MTB tosse, fala ou espirra em que são produzidas partículas infectantes denominadas núcleos de Wells contendo de 1 a 3 bacilos viáveis, podendo ficar em suspensão por longos períodos (MCNERNEY et al., 2012). A transmissão segue quando um indivíduo suscetível entra em contato com as partículas suspensas no ar, inalando-as, possibilitando assim a infecção (BAÑULS et al., 2015; DHEDA; BARRY; MAARTENS, 2015; TEO; LIM, 2004).

Entre os indivíduos que entram em contato com MTB, 5% a 10% desenvolvem a doença ativa, apresentando sintomas que podem se manifestar logo após a infecção ou após um longo tempo (DHEDA; BARRY; MAARTENS., 2015; PAI et al., 2016). Alguns indivíduos podem eliminar os bacilos ou conter a infecção em um estado de latência (MCNERNEY et al., 2012). Há suspeita de que um paciente esteja com a doença quando apresenta tosse, febre, perda de peso, sudorese noturna, além de sintomas específicos dependendo do órgão afetado (DHEDA; BARRY; MAARTENS, 2015; PAI et al., 2016). Nos casos em que o pulmão é afetado o paciente pode apresentar hemoptise, dor no peito e dispneia (CURVO-SEMEDO; TEIXEIRA; CASEIRO-ALVES, 2005). A OMS (Organização Mundial da Saúde) estima que

atualmente $\frac{1}{4}$ (um quarto) da população mundial esteja com a infecção na forma latente (WHO, 2020).

A importância de uma terapia antimicrobiana eficaz é evidenciada pelos atuais desafios da resistência e tolerância, nos quais os medicamentos podem não ter efeito sobre as células bacterianas devido a diversos fatores, tais como a dificuldade de ação sobre microrganismos submetidos a ambientes deficitários de nutrientes, interações célula-célula em populações heterogêneas, interação patógeno-hospedeiro e em microrganismos em estado metabólico reduzido, além de mutações específicas (TURAPOV et al., 2014; 2016).

Foi demonstrado que MTB pode estar em estados metabólicos diversos quando encontrados em amostras de escarro e de pacientes com TB, e que esses microrganismos apresentam maior resistência *in vitro* a drogas utilizadas no tratamento anti-TB, desaparecendo mais lentamente das amostras de escarro ao longo do tratamento (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2020) e não podem ser detectados pelos métodos fenotípicos convencionais (MUKAMOLOVA et al., 2010).

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Embora alguns cientistas já tivessem tentado explicar a etiologia da tuberculose anteriormente, o bacilo só foi de fato descrito em 1882 por Robert Koch (PAI et al., 2016). Essa descoberta deu ao cientista alemão o prêmio Nobel em 1905 e serviu de base para a elaboração do Postulado de Koch, juntamente com os conhecimentos sobre o *Bacillus anthracis* (BLOOM; MURRAY, 1992).

O gênero *Mycobacterium* é composto por 245 espécies e 24 subespécies de acordo com LPSN (do inglês *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*) (2021), sendo importante ressaltar que esses números estão em constante mudança. Dentre as espécies de maior importância clínica e impacto na saúde humana, destacam-se *Mycobacterium tuberculosis* e *M. leprae*, causadores da tuberculose e hanseníase, respectivamente (GAO; GUPTA, 2012).

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) compreende um grupo de espécies capazes de causar tuberculose em humanos e animais (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. mungii*, *M. orygis*, *M. surricatae*) que compartilham uma série de semelhanças, principalmente genéticas (AZÉ et al., 2015; FORRELLAD et al., 2013).

Grande parte da sua virulência está relacionada à parede celular complexa formada principalmente por lipídeos, que proporciona uma barreira impermeável capaz de proteger a célula bacteriana de vários agentes nocivos (DELOGU; SALLI; FADDA, 2013). Possui crescimento lento, com tempo de geração entre 12 e 24 horas em condições ótimas, podendo levar até 2 meses para a formação de colônias visíveis em meio sólido (FERREIRA; MORAES, 2013).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Mesmo diante de um cenário de evolução no diagnóstico e tratamento da TB, a doença ainda se mantém entre as 10 maiores causas de morte no mundo, sendo que até o ano de 2020 era considerada a doença mais letal causada por um único agente

infecioso, perdendo sua posição para a atual situação envolvendo a pandemia da Covid-19 (WHO, 2020).

De acordo com o último relatório global da OMS publicado em 2020, no mundo, são estimados cerca de 10 milhões de novos casos por ano, sendo que desses 1,4 milhões foram a óbito em 2019 (WHO, 2020). Apesar da diminuição na incidência nos últimos anos, a evolução ainda é lenta o que dificulta alcançarmos o marco estabelecido pela Estratégia de Fim da Tuberculose (*The End TB Strategy*) até 2035. De 2015 a 2020 houve uma redução na incidência acumulada de 9%, sendo que o esperado era 20%. A Figura 1 mostra a incidência mundial estimada de TB no ano de 2019 por 100.000 habitantes (WHO, 2020).

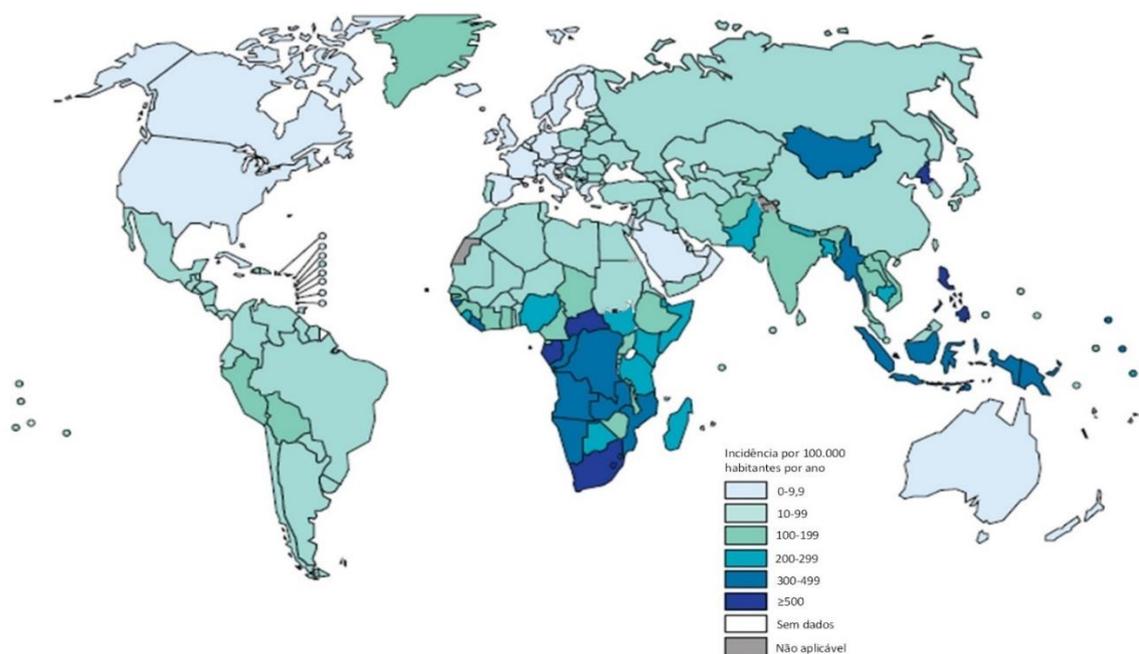


Figura 1 – Incidência estimada de Tuberculose em 2019. **Fonte:** Adaptado de WHO, 2020.

Com relação à TB multirresistente ou resistente à Rifampicina (MDR/RR-TB), 206.030 casos foram detectados e notificados em 2019, com um aumento de 10% com relação à 2018 (186.883 casos) (WHO, 2020). O Brasil aparece na classificação de 0 a 2,9% de novos casos de MDR/RR-TB, de acordo com o último relatório global da OMS (WHO, 2020).

A OMS ainda criou uma classificação de países prioritários no combate à TB para o período de 2016 a 2020 com relação a carga da doença, coinfeção TB-HIV e multidroga resistência incluindo 48 países (BRASIL, 2017). O Brasil aparece nos dois primeiros critérios (Fig. 2).

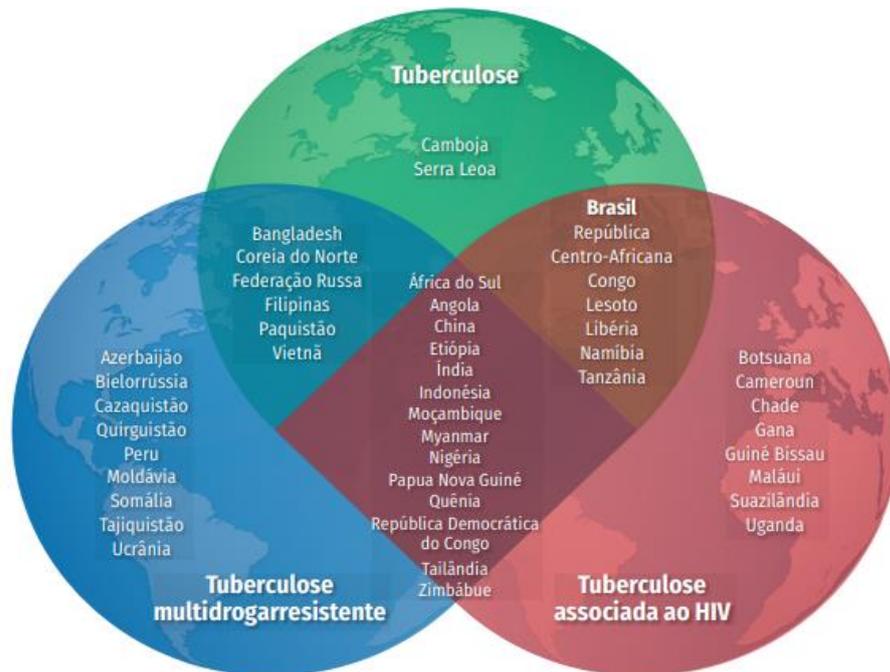


Figura 2 – Classificação de países prioritários no combate à Tuberculose de 2016 a 2020. **Fonte:** Adaptado de Ministério da Saúde, 2017.

No Brasil, apenas no ano de 2019, foram registrados 73.864 novos casos de TB sendo que 8,4% representavam coinfeção com HIV. Em 2018, 71,9% dos novos casos de TB pulmonar obtiveram cura por confirmação laboratorial, porém cerca de 4.500 mortes foram notificadas (BRASIL, 2020).

2.3 TRATAMENTO

O tratamento com o esquema básico consiste na administração por via oral de Rifampicina, Isoniazida, Etambutol e Pirazinamida diariamente por quatro meses, sendo essa a fase intensiva, e mais 2 meses apenas com Rifampicina e Isoniazida para a fase manutenção, podendo ser prolongada dependendo da evolução do paciente. Esse regime é empregado para novos casos desde que sejam sensíveis às drogas de primeira linha (BRASIL, 2019; WHO, 2010). O controle bacteriológico é de grande importância no monitoramento do tratamento, possibilitando o rastreamento de falha terapêutica, não adesão ou possível resistência (BRASIL, 2019).

O Ministério da Saúde ainda indica a necessidade de um esquema de tratamento com uma ou duas drogas (Rifampicina ou Isoniazida) para casos de infecção latente (ILTB) (BRASIL, 2019).

Já os casos de resistência requerem modificações no esquema de tratamento incluindo drogas de segunda linha (WALLIS et al., 2016). No geral, a OMS passou a recomendar a utilização de drogas de forma individual observando cada caso de resistência (WHO, 2020).

Enquanto os casos de monorresistência à Isoniazida (Hr-TB) são tratados substituindo a droga por Levofloxacina, em pacientes MDR/RR-TB o esquema deve ser montado de modo que o tratamento se inicie com pelo menos 4 drogas seguindo a ordem de escolha por grupo (WHO, 2020). A Tabela 1 apresenta a classificação dos antimicrobianos de segunda linha quanto ao grupo de escolha.

Tabela 1 – Classificação dos grupos de antimicrobianos de segunda linha no tratamento de TB.

GRUPO	ANTIMICROBIANO
A	Levofloxacina OU Moxifloxacina
	Linezolida
	Bedaquilina
B	Clofazimina
	Cicloserina OU Terizidona
C	Etambutol
	Delamanida
	Pirazinamida
	Imipenem-cilastina OU Meropenem
	Amicacina OU Estreptomicina
	Etionamida OU Protionamida
	Ácido para-aminossalicílico

Fonte: Adaptado de WHO, 2019.

Casos de XDR-TB (Tuberculose Extensivamente Resistente) envolvem resistência à Isoniazida e Rifampicina, como as MDR-TB e ainda a qualquer uma das fluoroquinolonas (levofloxacina ou moxifloxacina) e a pelo menos uma droga adicional do grupo A (SOTGIU et al., 2009; WHO, 2021). O tratamento segue o esquema para MDR-TB utilizando as drogas sensíveis.

Uma das grandes dificuldades na erradicação da doença é a não adesão ao tratamento que pode levar à falha terapêutica, recidiva e os surgimento de resistência (PAI et al., 2016).

2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico rápido e preciso é importante para que a doença seja detectada, e o paciente possa receber o tratamento o mais rápido possível, evitando a disseminação da doença. O diagnóstico laboratorial convencional é baseado na baciloscopia e no cultivo de bactérias da amostra biológica recebida (BRASIL, 2008).

2.4.1 Exame por microscopia direta

A detecção direta de MTB é possível utilizando a técnica de coloração Ziehl-Neelsen (ZN), por tratar-se de uma bactéria álcool-ácido resistente e, portanto, não podendo ser corada pelo método de Gram. Essa técnica pode ser feita em uma hora, sendo um teste rápido e barato para detecção da TB e sua sensibilidade varia de 20 a 80%. Após a coloração, submete-se a amostra a observação microscópica, e a avaliação seguirá a escala de qualificação internacional (EL KHÉCHINE; DRANCOURT, 2011). O esfregaço pode ser feito de forma direta colocando a porção mais purulenta da amostra na lâmina ou após concentração por centrifugação (BRASIL, 2008).

Outro método de detecção do MTB por microscopia é por fluorescência, no qual é usado o corante Auramina-O. O método apresenta distintas vantagens, como a obtenção de maior contraste, e apresenta uma maior sensibilidade em comparação com a técnica de ZN. Assim, a técnica é sugerida para uma observação e identificação rápida do MTB por microscopia (ANTHONY et al., 2006).

2.4.2 Cultura bacteriana

A cultura para micobactérias é considerada uma técnica fundamental e de grande eficácia no diagnóstico da TB, sendo dessa forma considerada padrão ouro para o diagnóstico da doença. O cultivo de MTB pode ser feito em meios sólidos ou

líquidos. Os meios sólidos mais utilizados são Lowenstein-Jensen (LJ) e Ogawa-Kudoh, que são a base ovo; e Middlebrook 7H10 e 7H11, que são à base de ágar, transparentes e contribuem para uma rápida observação de colônias. O tempo médio de crescimento em meio LJ é de 27 dias (EL KHÉCHINE; DRANCOURT, 2011).

Além dos meios sólidos, existem ainda os meios líquidos que têm diminuído consideravelmente o tempo de detecção do crescimento. Os métodos mais utilizados são o cultivo em Middlebrook 7H9 e sistema automatizado BACTEC™ MGIT™ 960. O tempo médio de detecção pelo sistema automatizado varia de 8 a 12,9 dias (EL KHÉCHINE; DRANCOURT, 2011; PERES et al., 2011) e foi desenvolvido como uma alternativa não radiométrica para substituir o modelo BACTEC™ 460 (SCARPARO et al, 2004).

O meio líquido ainda se sobressai no quesito sensibilidade. Enquanto o BACTEC™ MGIT™ 960 apresenta uma sensibilidade igual a 88%, a cultura em meio sólido apresenta 76%. Apesar das inúmeras vantagens, a utilização de meio de cultura líquido tem suas limitações: maior risco de contaminação por outros microrganismos ou outras micobactérias sem importância clínica; e a contaminação cruzada entre amostras durante o processamento e inoculação (RODRIGUES; VADWAI, 2012).

O sistema BACTEC™ MGIT™ 960 possui tubos com meio de cultura Middlebrook 7H9 modificado com a presença de um fluorocromo incorporado em silicone na parte inferior do tubo. Durante o crescimento bacteriano dentro do tubo, o oxigênio livre é utilizado e substituído por dióxido de carbono. Com o esgotamento do oxigênio livre, o fluorocromo não é mais inibido, resultando em fluorescência dentro do tubo MGIT™ (do inglês *Mycobacterial Growth Indicator Tube*) quando visualizado sob luz ultravioleta. A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à extensão da depleção de oxigênio (PALOMINO, 2006; SIDDIQI; RÜSCH-GERDES, 2006).

2.4.3 Xpert® MTB/RIF

Um grande avanço não só no diagnóstico de TB, mas também na detecção de resistência à rifampicina foi o lançamento do Xpert® MTB/RIF da Cepheid, que passou a ser implantado no sistema público de saúde no Brasil em 2013 (LIMA et al., 2017).

O ensaio Xpert MTB/RIF é um PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real semiquantitativo, que detecta a presença do complexo MTB por meio da

sequência específica do gene *rpoB* sendo capaz também de verificar a existência de mutações nesse gene que conferem resistência à rifampicina (MILLER et al, 2011; LIMA et al., 2017).

Mais recentemente Xpert® MTB/RIF Ultra foi criado para melhorar algumas limitações da versão anterior, como uma maior sensibilidade nos casos de amostras paucibacilares (DORMAN et al., 2018).

2.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Assim como no diagnóstico laboratorial, os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) têm sido desenvolvidos e melhorados no intuito de diminuir o tempo de espera e obter resultados cada vez mais precisos possibilitando maior controle da doença (PHOLWAT et al., 2011).

No geral, os métodos se dividem em diretos, quando é usado o espécime clínico do paciente para fazer o TSA, e indireto quando usamos uma cultura com o isolado bacteriano (CANETTI et al., 1963). Os métodos ainda podem ser separados quanto à detecção de mutações no genoma que possam conferir resistência (genotípicos) ou a presença de características de resistência no microrganismo (fenotípicos) (CANETTI et al., 1963; JAIN et al., 2011). Cada forma de realização de TSA possui vantagens e desvantagens quanto à execução prática, tempo, custo e confiabilidade nos resultados (CHATKIN; CHAIEB, 1982).

2.5.1 Métodos genotípicos

Métodos genotípicos são reconhecidos por oferecerem resultados mais rápidos e menores nos riscos de manipulação, porém estão restritos ao conhecimento prévio do tipo de mutação, possibilidade de falsos-negativos quando a resistência é apenas fenotípica, além de possuírem custos mais elevados (CHAKRAVORTY et al., 2015; CHEGOU et al., 2011).

Em relação à sensibilidade de MTB às drogas de primeira linha, muitos métodos já estão bem padronizados, porém poucos conseguem ser inseridos em uma rotina laboratorial (CHEGOU et al., 2011). Esses métodos são baseados na amplificação do

material genético buscando alterações específicas que conferem resistência (PALOMINO, 2006).

O Xpert® MTB/RIF se destaca na detecção de resistência à rifampicina por meio da amplificação por PCR da região determinante da resistência à rifampicina (do inglês *Rifampicin Resistance Determining Region - RRDR*) do gene *rpoB* de *M. tuberculosis* (BLAKEMORE et al., 2010). Embora o método seja capaz de diagnosticar corretamente a resistência à rifampicina em 95% dos casos, existe uma certa preocupação com a evolução microbiana a longo prazo, já que uma sequência específica deve ser conhecida para garantir a eficácia contínua do teste (JAIN et al., 2011).

2.5.2 Métodos fenotípicos

As técnicas fenotípicas baseiam-se basicamente na busca por fenótipos de resistência observadas pelo crescimento bacteriano na presença de antimicrobianos e são considerados o padrão-ouro na determinação de resistência em MTB (AHMAD et al., 2016).

Técnicas que utilizam meios à base de ovo são amplamente padronizadas e de baixo custo, possibilitando sua execução. Elas são baseadas em três métodos principais: o da concentração absoluta, que determina a resistência quando mais de 1% da população cresce em determinada Concentração Crítica (CC) do antimicrobiano; razão de resistência, que compara a cepa teste com uma cepa de referência; e o método das proporções, que é capaz de determinar a porcentagem resistente à droga (CANETTI et al., 1963; CHATKIN; CHAIEB, 1982).

Diferentes métodos de avaliação de sensibilidade de MTB a drogas têm sido empregados, e embora tenham mostrado ótimos resultados, são difíceis de serem inseridos na prática clínica (PALOMINO, 2006). Entre eles, destacam-se os métodos colorimétricos, que se baseiam na metabolização de um indicador, sendo mais frequente o uso da resazurina (Alamar Blue®) (CHO; LEE; FRANZBLAU, 2015); ensaio da nitrato redutase, baseado na capacidade da redução do nitrato a nitrito pela bactéria (MIRANDA et al., 2017); e o ensaio MODS (do inglês *Microscopic Observation Drug Susceptibility*), que visualiza o crescimento bacteriano em placas utilizando microscopia de luz invertida através de um teste direto (TROLLIP et al., 2014).

2.5.2.1 MGIT

Alguns sistemas automatizados foram desenvolvidos para a determinação de resistência fenotípica em MTB como o MB/BacT system (Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands), VersaTREK (TREK Diagnostics) e o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), sendo esse último o que atualmente é considerado o padrão-ouro dos testes fenotípicos e foi criado para substituir a versão radiométrica (BACTEC 460 TB) (AHMAD et al., 2016; DÍAZ-INFANTES et al., 2000; ESPASA et al., 2012;).

O sistema BACTEC™ MGIT™ 960 é um teste qualitativo que demora de 4 a 13 dias partindo de um isolado clínico sendo, portanto, um teste indireto (ARDITO et al., 2001; PALOMINO, 2006). Com ele, é possível testar a sensibilidade a cinco drogas, sendo elas Estreptomina, Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Pirazinamida (SCARPARO et al., 2004). Embora não faça parte do kit de drogas do sistema, vários estudos já validaram a testagem de antimicrobianos de segunda linha utilizando o sistema (HUANG et al., 2004; KIM et al., 2013; RODRIGUES et al., 2008).

2.5.2.2 Método de Microdiluição em Caldo

A microdiluição utiliza uma série de concentrações de determinado antimicrobiano possibilitando a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) necessária da droga para inibir o crescimento de determinado isolado clínico (CLSI, 2018). Essa técnica utiliza placas com 96 poços permitindo a testagem de diferentes concentrações de antimicrobianos em uma mesma placa (HALL et al., 2011).

Embora não seja considerado um método amplamente padronizado para MTB, muitos estudos têm inserido a utilização para a testagem de drogas de primeira e segunda linha no tratamento de TB (COBAN et al., 2004; KANIGA et al., 2016; LEITE et al., 2000). Em geral, utiliza-se o meio de cultura líquido MiddleBrook 7H9 suplementado com OADC (do inglês *Oleic Acid, Albumin, Dextrose, Catalase*) (BD™ BBL™) distribuídos em placas de 96 poços, em que são inseridos os antimicrobianos seguindo com as diluições necessárias. Após a adição de um inóculo padronizado, o crescimento é acompanhado por até 21 dias para a determinação da CIM, sendo aquele isolado considerado resistente quando esse valor ultrapassa a CC pré-estabelecida (CLSI, 2018; KANIGA et al., 2016).

2.6 RESISTÊNCIA, PERSISTÊNCIA E DORMÊNCIA

Quando o assunto é dormência, uma série de termos criados com o passar dos anos aparecem atrelados e por vezes, geram divergências semânticas. Segundo Balaban e colaboradores (2019), é necessário diferenciar termos como resistência, tolerância, persistência e dormência.

Enquanto as bactérias resistentes sobrevivem a altos níveis de antimicrobianos resultando em uma CIM elevada, na tolerância e persistência antibiótica a CIM é semelhante à da população sensível. A diferença está no tempo mínimo para a morte (MDK, do inglês *Minimum Duration for Killing*) que é maior na tolerante e na persistente, sendo que nessa última ainda ocorre uma curva de morte bifásica (BALABAN et al., 2019). A resistência em si é normalmente causada por mutações herdadas e se associa a diversos mecanismos que diminuem a eficácia do antimicrobiano (BRAUNER et al., 2016). É importante ressaltar que esses termos estão relacionados à resposta do microrganismo aos frente aos antimicrobianos (BALABAN et al., 2019).

Quando exposto a situações de estresse como hipóxia, meio ácido, privação de nutrientes e fontes de carbono e exposição a baixas concentrações de antimicrobianos (ALNIMR, 2015; GOLD; NATHAN, 2017; MANINA; DHAR; MCKINNEY, 2015) o bacilo restringe seu crescimento remodelando o metabolismo para uma série de alterações que envolvem a diminuição de gasto de energia e mecanismos de sobrevivência (CHANG; GUAN, 2021; WAYNE; SOHASKEY, 2001). Um exemplo disso é a ocorrência de uma extensa remodelação dos lipídios micobacterianos, incluindo o acúmulo de Triacilglicerol (TG) e o espessamento da parede celular (CUNNINGHAM; SPREADBURY, 1998). A reorganização dos lipídios pode influenciar na capacidade de ser álcool-ácido resistente, como mostrado em modelos de dormência que perderam a capacidade de reter os corantes utilizados nas técnicas de ZN ou Auramina O (VILCHÈZE; KREMER, 2017). A parede espessada pode servir como mecanismo de proteção a ambientes hostis, como as condições tóxicas associadas aos granulomas (CUNNINGHAM; SPREADBURY, 1998). Essas alterações caracterizam o estado metabólico conhecido como dormência. Frequentemente, essas modificações fazem com que esses bacilos sejam mais tolerantes aos antimicrobianos e não cresçam em meios convencionais de cultura, apesar de serem viáveis quando estão em condições ambientais favoráveis para seu

desenvolvimento (BALABAN et al., 2019). Esse estado não replicante é responsável pela infecção latente por MTB com possibilidade de desenvolver a doença ativa após uma falha do sistema imune e reativação dessas populações (WAYNE, 1994). Enquanto populações dormentes podem representar até 100% da população total de bacilos (MUKAMOLOVA et al., 2010), as consideradas persistentes em geral representam apenas 0,01% (BALABAN et al., 2019).

Apesar das diferentes representações desses termos, eles estão estritamente ligados. Em um experimento conduzido por Levin-Reisman e colaboradores (2017) foi mostrado que exposições intermitentes a antimicrobianos levam rapidamente à evolução da tolerância e que a tolerância aumenta as chances de mutações de resistência se espalharem na população.

Diferentes subpopulações de MTB foram descritas por Chengalroyen e colaboradores (2016) que variam quanto ao meio de crescimento e necessidade de algum componente específico para seu desenvolvimento (Fig. 3). A proporção dessas subpopulações pode variar entre os pacientes, mas são geralmente bem representativas da população total de bacilos em um espécime clínico (MUKAMOLOVA et al., 2010). Nesse estudo, nos referimos como população total àquela composta pelas populações ressuscitáveis e metabolicamente ativas de MTB em conjunto.

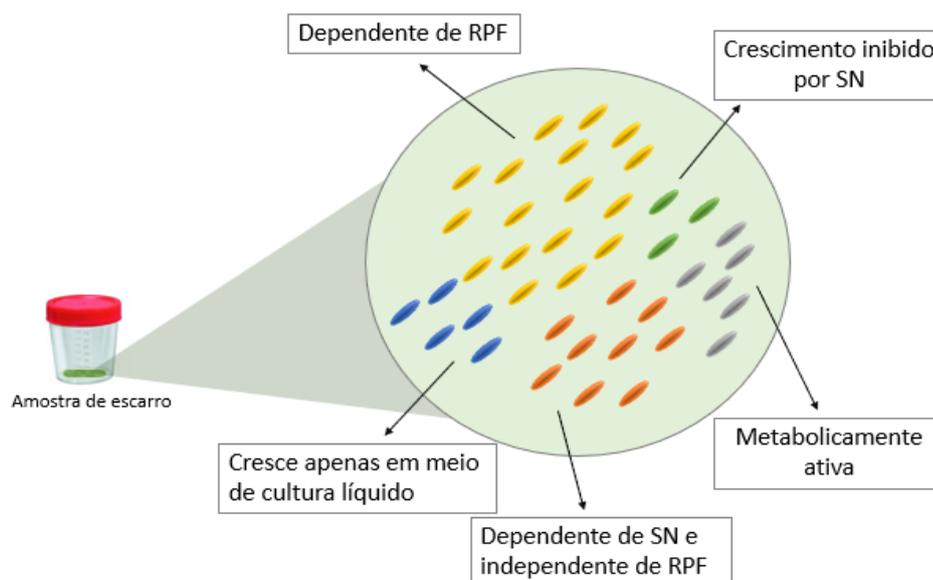


Figura 3 – Diferentes subpopulações de MTB presentes em uma amostra de escarro de paciente com tuberculose pulmonar. As diferentes populações de bacilos são diferenciadas por colorações. SN: Sobrenadante de cultura líquida de MTB. RPF: Fator Promotor de Ressuscitação. Imagem meramente ilustrativa, e as quantidades de cada população não representam uma proporção real. Informações baseadas nos resultados de Chengalroyen e colaboradores (2016).

2.6.1 Dormência e antibioticoterapia

Acredita-se que a presença de subpopulações em estados metabólicos reduzidos e mais tolerantes aos antimicrobianos seja a razão pela qual o esquema de tratamento recomendado pela OMS necessita de 6 meses para alcançar uma cura de 86% na de rotina (GOLD; NATHAN, 2017).

Em experimentos conduzidos com camundongos um terço dos animais tiveram recidiva dois meses após o tratamento com Isoniazida e Pirazinamida, mesmo sem crescimento de colônias em meio sólido, indicando a presença de subpopulações mais tolerantes às drogas que são indetectáveis pelos métodos convencionais (SCANGA et al., 1999).

Em uma coorte conduzida por Almeida Júnior e colaboradores (2020) foi mostrado que no primeiro e segundo mês após o início do tratamento, subpopulações de MTB ainda eram encontradas em amostras de escarro de alguns pacientes do estudo, mesmo quando não era possível encontrar bacilos viáveis pelos métodos convencionais.

Dentre os antimicrobianos utilizados no esquema básico de tratamento, a Pirazinamida parece ser o que mais atua contra subpopulações dormentes (CAÑO-MUÑIZ et al., 2018), possivelmente pela sua capacidade de esgotar os reservatórios de coenzima A que parece ser essencial apenas em células dormentes (ROSEN et al., 2017).

Dentre as estratégias para a eliminação dessas subpopulações está a utilização de novos antimicrobianos que possuem a capacidade de atingir esse tipo de célula (CAÑO-MUÑIZ et al., 2018). Um exemplo disso é a Bedaquilina que tem como alvo a ATP sintase (Adenosina Trifosfato sintase), já que a produção de ATP se mantém mesmo em metabolismos reduzidos, porém em níveis mais baixos (CHANG; GUAN, 2021).

Alguns estudos ainda propõem algumas estratégias para otimizar o tratamento, como uso intermitente (MENZIES et al., 2009) ou altas doses do antimicrobiano (MILSTEIN et al., 2016), ressuscitação das populações dormentes utilizando Fator Promotor de Ressuscitação (GAN; YAO; GUO, 2015) e ainda o emprego de imunossupressores (MAYANJA-KIZZA et al., 2005). Embora promissoras, essas estratégias ainda apresentam muitas desvantagens e divergências no emprego (CAÑO-MUÑIZ et al., 2018).

2.7 FATOR PROMOTOR DE RESSUSCITAÇÃO

O RPF (do inglês, *Ressuscitation Promoting Factor*) é um conjunto de proteínas descrito inicialmente por Kaprelyants e colaboradores (1993) como uma substância produzida por *Mycrococcus luteus* capaz de auxiliar no crescimento de outros microrganismos em estados metabólicos lentos. Cinco anos depois, Mukamolova e colaboradores (1998) utilizaram essa proteína preparada a partir de cultura de *M. luteus* para ressuscitar micobactérias.

MTB sintetiza um conjunto de cinco proteínas (*RpfA – RpfE*) que têm como uma de suas principais funções a estimulação de crescimento bacteriano, e apesar de seu mecanismo ainda não estar bem elucidado, acredita-se que isso possa ocorrer pela facilitação da difusão através da parede celular (KANA; MIZRAHI, 2010).

A expressão dos genes *rpf* se altera durante diferentes estágios de crescimento e sob estresse, indicando que eles possam desempenhar papéis distintos. Na ressuscitação precoce, todos os genes *rpf* foram expressos, sendo maiores para *rpfA* e *rpfD*, enquanto o *rpfC* apresentou-se de forma consistente durante todos os estágios de crescimento e na privação de nutrientes. Em fatores de estresse como meio ácido foi verificada maior expressão de *rpfD* e *rpfE* e na hipóxia de *rpfC* e *rpfE* (GUPTA; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA; 2010).

Em amostras de escarro de pacientes com tuberculose pulmonar, a utilização de RPF mostrou revelar uma população de 80 a 99,99% de bacilos ocultos que cresceram apenas na presença dessas proteínas em 20 de 25 amostras do estudo (MUKAMOLOVA et al., 2010).

O preparo de um filtrado de sobrenadante (SN) de cultura líquida de MTB pode ser usado para a ressuscitação desses bacilos ocultos, já que o RPF produzido pelas bactérias fica disperso no meio (MUKAMOLOVA et al., 2010). Além desse conjunto de proteínas, algumas outras substâncias desconhecidas são produzidas pelas bactérias e fazem parte da composição desse filtrado de cultura de MTB, que também auxiliam no crescimento de populações ocultas (CHENGALROYEN et al., 2016). Essas populações aparecem inclusive em amostras com baciloscopia e cultura negativa, representando quase a totalidade de bacilos em alguns casos (DUSTHACKEER et al., 2019).

Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

Uma terapia antimicrobiana eficaz constitui um dos maiores desafios no combate à Tuberculose, visto que falhas terapêuticas podem acontecer por diversos motivos (NAMUKWAYA et al., 2011). Além disso, pode ocorrer recidiva da doença mesmo após cura clínica, sendo que esse acontecimento também possui diversos fatores associados e não bem elucidados (NAIDOO; DOOKIE, 2018). Em 2020, a OMS relatou que 6,8% dos casos de TB foram classificados como recidivas (WHO, 2020).

Bacilos ocultos em estados metabólicos diversos têm sido encontrados e podem representar até 100% de uma população de bactérias isoladas de amostras de escarro, aparecendo em 80% dos pacientes com TB pulmonar (SCANGA et al., 1999; ALMEIDA JÚNIOR et al., 2020). Como mostrado, essas populações não podem ser detectadas pelos métodos fenotípicos convencionais, visto que necessitam de componentes diferentes para se desenvolverem em meios de cultura (CHENGALROYEN, et al., 2016). Acredita-se que essa população de bacilos dormentes pode representar um obstáculo no tratamento da TB, por serem mais tolerante às drogas (TURAPOV et al., 2016), podendo então ser a origem de recidivas, que necessitariam de maior tempo de tratamento para a cura clínica desses pacientes (ROSSER et al., 2017).

Considerando que os testes de sensibilidade a drogas são baseados na proporção de bacilos resistentes em relação ao total de bacilos sensíveis na amostra, ou seja, na taxa/proporção de mutantes resistentes na população total bacteriana (CANETTI, 1963), é fundamental que o teste de sensibilidade utilizado avalie todas as populações de MTB presentes em amostras de pacientes com TB pulmonar, incluindo as dependentes de RPF e dos demais componentes do sobrenadante de cultura líquida de MTB. Desta forma, o resultado do teste permitiria uma maior representatividade do real perfil de suscetibilidade da população bacteriana do paciente, e casos de falha terapêutica sem motivo aparente poderiam ser explicados pela presença de bacilos ocultos com perfil de suscetibilidade diferente às drogas e que não são visualizados pelos testes diagnósticos convencionais (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2020).

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos da população total de *Mycobacterium tuberculosis* isolado de amostras de escarro de pacientes com tuberculose pulmonar difere do perfil da população ativa.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar se o filtrado de sobrenadante de cultura líquida de *M. tuberculosis* estimula apenas a velocidade de crescimento de *M. tuberculosis*, sem interferir diretamente na carga bacilar final detectada pelo método Número Mais Provável;
- 2) Avaliar se a lavagem da amostra digerida/descontaminada e o processo de congelamento diminuem os fatores inibidores presentes no escarro e contribuem para melhorar o isolamento de *M. tuberculosis*;
- 3) Determinar qual a melhor composição de meio de cultura líquido para promover o isolamento em tubo das diferentes populações de *M. tuberculosis* provenientes de amostras de escarro de pacientes com tuberculose pulmonar;
- 4) Determinar qual o melhor método para o isolamento das diferentes populações de *M. tuberculosis* (direto ou indireto) para a realização do Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos utilizando a população total de bacilos;
- 5) Determinar qual o tempo mínimo de exposição da amostra ao sobrenadante de cultura líquida de MTB para se obter a maior taxa de bacilos resuscitáveis quando comparado à um meio de cultura controle convencional;
- 6) Avaliar se a presença de populações de bacilos dormentes pode influenciar no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de primeira e segunda linha no tratamento de tuberculose pulmonar.

Materiais e Métodos

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Trata-se de um estudo de caráter experimental comparativo de técnicas. Foi dividido em duas etapas. A primeira consistiu na padronização da obtenção da população total de bacilos por meio da utilização de meio de cultura contendo sobrenadante de cultura líquida de MTB, e da padronização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de microdiluição em caldo. A segunda etapa testou os métodos padronizados utilizando amostras de escarro espontâneo de pacientes com tuberculose pulmonar. A Figura 4 apresenta o fluxograma de execução dos testes com as etapas detalhadas. Todo o estudo foi conduzido no Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

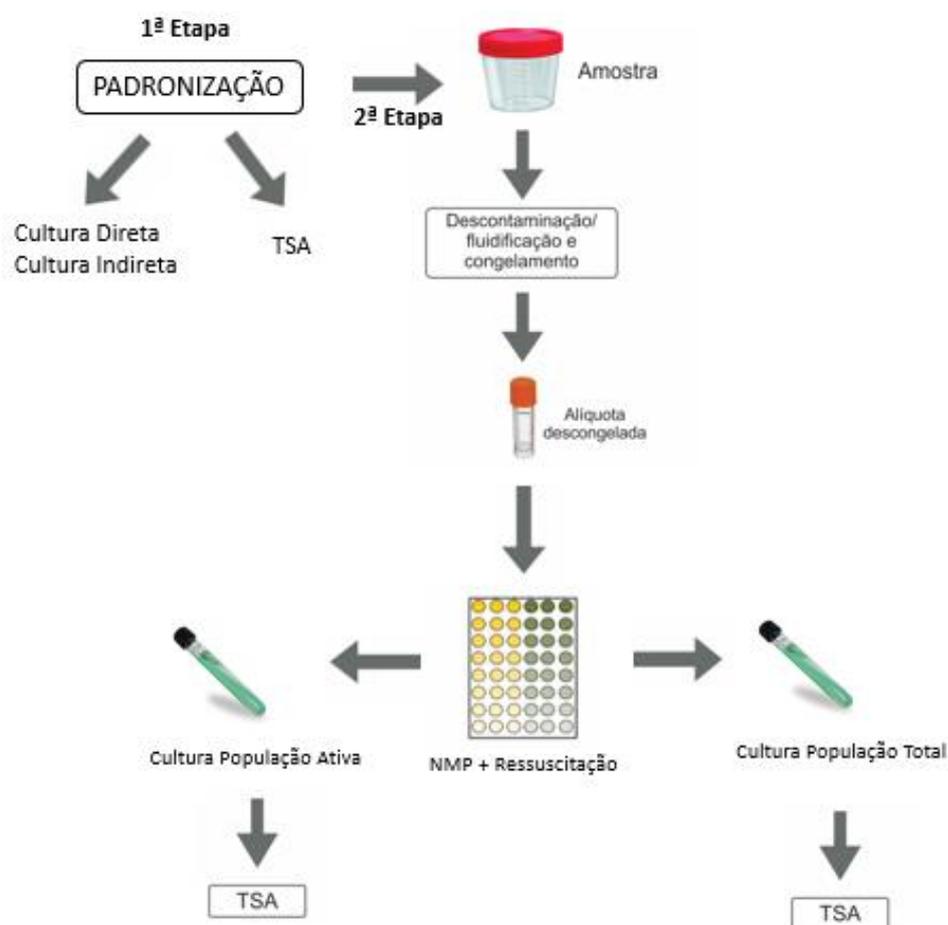


Figura 4 – Delineamento experimental do estudo. NMP: Número Mais Provável. TSA: Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

5.2 AMOSTRAS CLÍNICAS

Nesse estudo, foram utilizadas 54 amostras de escarro espontâneo de pacientes com tuberculose pulmonar enviadas ao Laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES para o diagnóstico. Após a liberação pela rotina laboratorial, as amostras disponíveis foram selecionadas para o estudo de acordo com os critérios abaixo:

5.2.1 Critérios de Inclusão

- Amostra de escarro com resultado positivo para MTB pelo método Xpert[®] MTB/RIF;
- Segunda amostra de escarro de pacientes com resultado positivo para MTB pelo método Xpert[®] MTB/RIF na primeira amostra;
- Volume mínimo de 2 ml.

5.2.2 Critérios de Exclusão

- Uso prévio de antimicrobianos para o tratamento de TB pelo paciente;
- Amostra coletada a mais de 7 dias.

5.3 CEPAS DE REFERÊNCIA

Para as etapas de padronização do TSA foram utilizadas as seguintes cepas de referência obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC): *M. tuberculosis* H₃₇R_v (ATCC[®] 27294[™]), *M. tuberculosis* H₃₇R_v-RIF-R (ATCC[®] 35822[™]), *M. tuberculosis* H₃₇R_v-IHN-R (ATCC[®] 35838[™]) e *M. tuberculosis* H₃₇R_a (ATCC[®] 25177[™]). Além disso, foram utilizados isolados com perfis de resistência conhecidos, armazenados a -70°C pertencentes ao Laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES.

5.4 ANTIMICROBIANOS

Para a realização do TSA pelo método de Microdiluição em Caldo foram selecionadas 4 (quatro) antimicrobianos de primeira linha para o tratamento de

tuberculose pulmonar: Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), Etambutol (EMB) e Pirazinamida (PZA). Além disso, foram incluídas 7 (sete) drogas de segunda linha, sendo elas 3 (três) pertencentes ao Grupo A: Levofloxacina (LFX), Bedaquilina (BDQ) e Linezolida (LZD); 2 (duas) do Grupo B: Clofazimina (CFZ) e Cicloserina (CS); e 2 (dois) aminoglicosídeos injetáveis pertencentes ao Grupo C: Estreptomicina (SM) e Amicacina (AMK). Todos os antimicrobianos utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich®, com exceção da Bedaquilina que foi adquirida da Santa Cruz Biotecnology®.

5.5 PROCEDIMENTOS ESPECÍFICOS

5.5.1 Preparo do sobrenadante de cultura líquida de MTB

Para a obtenção do sobrenadante de cultura líquida de MTB (SN) contendo RPF preparamos uma pré-cultura de MTB utilizando a cepa H₃₇R_v em meio 7H9 suplementado com 10% de OADC (v/v), 0,2% de glicerol (v/v) e 0,05% de Tween 80 (v/v). A pré-cultura foi incubada a 37°C sob agitação (100 rpm) até atingir Densidade Ótica (DO_{580nm}) 0,5. Após alcançada a DO requerida, foi preparada uma nova cultura utilizando a pré-cultura anterior. O crescimento foi acompanhado até a DO 0,8.

Em seguida, a cultura foi submetida à centrifugação por 15 minutos a 3.000xg com subsequente filtração do sobrenadante duas vezes por um filtro de porosidade 0,22µm. O sobrenadante filtrado foi acondicionado em tubos de centrífuga de 15 ml (alíquotas de 6 ml) e congelado por 24 horas em freezer à -70°C. Para garantir as propriedades dos componentes presentes, as alíquotas foram liofilizadas por até 72 horas e em seguida armazenadas a -70°C até a utilização, não podendo exceder seis meses (MUKAMOLOVA et al., 2010). Vários lotes do SN foram preparados durante o desenvolvimento do estudo, sendo submetidos sempre ao controle de esterilidade antes da incorporação aos meios de cada teste.

5.5.2 Cálculo do Número Mais Provável (NMP) e taxa de bacilos resuscitáveis (%BR)

O método de NMP foi realizado com 49 amostras para comparação de crescimento de diferentes populações de MTB em placa. Para isso, foi utilizada uma

placa de 48 poços adicionando nas 3 primeiras colunas 0,45 ml de meio 7H9 suplementado com 10% de OADC (BD™ BBL™), 0,05% de Tween 80 e antibióticos (BD™ BBL™ MGIT™ PANTA™) denominado NMP, e nas 3 últimas colunas foi adicionado 0,45 ml do meio anterior acrescido de sobrenadante de cultura líquida de MTB (SN) preparado conforme descrito o item 5.5.1 denominado NMP_SN. Foi adicionado então 0,05 ml da amostra descongelada em cada poço da primeira linha da placa de 48 poços, seguindo a diluição seriada até a diluição 10^{-7} . Para a contagem de UFC/ml, foi retirado 10µl diretamente da amostra e de cada poço apenas das três primeiras colunas da placa de 48 poços e inoculado em placas de 7H11. Isso porque em experimentos preliminares foi observado que a inoculação dos poços contendo meio de cultura com adição de SN não reproduz o crescimento dos bacilos dormentes observados na placa de 48 poços, obtendo valores iguais aos observados nos poços que contêm apenas o meio de cultura convencional e reforçando a possibilidade de que o RPF perca ação em meio sólido. O procedimento foi realizado na placa de 48 poços e a inoculação em meio 7H11 estão demonstrados na Figura 5.

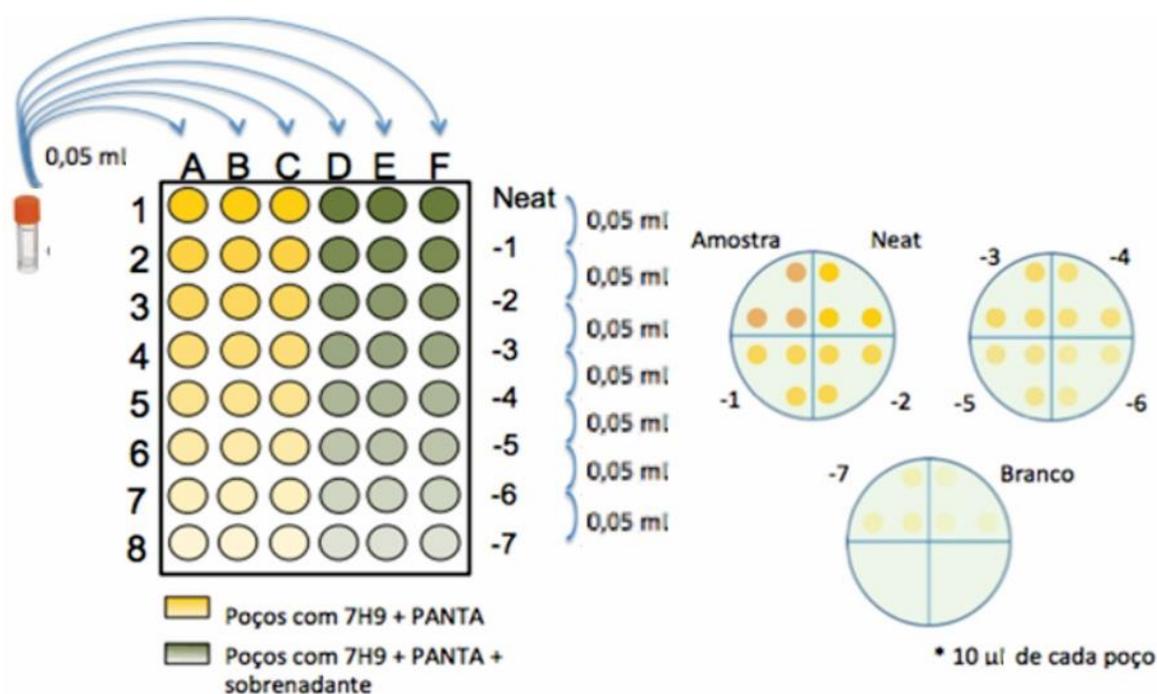


Figura 5 - Modelo esquemático do procedimento de diluição da amostra em placa de 48 poços para a realização da técnica de NMP. Círculos em amarelo indicam meio 7H9 (NMP) e os em verde indicam o meio 7H9 acrescido de sobrenadante (NMP_SN). À direita observamos o esquema de inoculação em placas de 7H11 dos poços contendo amostra diluída.

As placas foram embaladas em saco plástico estéril e incubadas a temperatura de 37°C, submetendo-as a leitura semanal até completar oito semanas. Para calcular a provável quantidade de UFC/ml na amostra, considerando os bacilos metabolicamente ativos e dependentes de sobrenadante, foi utilizada uma planilha de Excel gentilmente cedida pela Universidade de Leicester, através da Doutora Galina V. Mukamolova. Essa planilha possui uma fórmula matemática pré-definida que leva em consideração a quantidade de poços positivos nas diluições da placa (contendo meio de cultura 7H9 e meio 7H9 acrescido de SN), resultando em um NPM de bacilos presentes na amostra. Para as amostras que sofreram alteração no seu volume inicial, foi realizada uma correção dos valores obtidos pela planilha.

Para calcular a Taxa de Bacilos Ressuscitáveis (%BR) foi utilizada a seguinte fórmula: $\%BR = \text{NPM}_{\text{SN}} - \text{UFC/ml} / \text{NPM}_{\text{SN}} \times 100$. Por recomendação dos autores da metodologia e de acordo com observações prévias a contagem de UFC/ml em placa de 7H11 foi utilizada na fórmula por ter demonstrado melhor detecção dos bacilos ativos do que o meio líquido utilizado na placa de 48 poços (NMP). De acordo com os autores da metodologia, uma possível explicação para tal evento seria a presença de fatores inibidores de crescimento presentes no escarro que não teriam ação ao inocularmos em meio sólido (MUKAMOLOVA et al., 2010; TURAPOV et al., 2016).

Com base nos resultados obtidos por essa técnica, ainda foi possível calcular a Taxa de Ressuscitação ($TR = \log_{10}(\text{NMP}_{\text{SN}}/\text{UFC})$) e Taxa de Inibição ($TI = \log_{10}(\text{NMP}/\text{UFC})$).

5.5.2.1 Influência do uso de SN no crescimento de MTB

Para observar o comportamento de MTB quanto ao crescimento no meio convencional e com sobrenadante, foi proposto um experimento para calcular o NMP utilizando cepa de referência H₃₇R_v (possui apenas a população metabolicamente ativa).

Para isso, foi preparada uma suspensão bacteriana ajustada para Mc Farland 1,0, sendo essa a “amostra”, e em seguida foi inoculada na placa de 48 poços seguindo os passos descritos acima para a realização do NMP. O experimento foi realizado em triplicata.

5.5.3 Descontaminação, fluidificação e armazenamento das amostras

A metodologia de descontaminação e fluidificação utilizada nas amostras foi a de N-Acetil-L-Cisteína-Hidroxido de Sódio (NALC-NaOH). Essa solução depurante possibilita a descontaminação da amostra pela utilização de NaOH 4% e o NALC como agente de liquefação. Para evitar que possíveis metais pesados presentes na amostra possam inativar o NALC, é adicionado Citrato de Sódio 2,9%, devido a sua ação como agente quelante. (BRASIL, 2008). Além de ser a metodologia de escolha para a inoculação em sistemas automatizados, é também recomendada em amostras paucibacilares, sendo menos agressiva ao bacilo da tuberculose quando comparada aos demais métodos de descontaminação, com perda de apenas 28 a 33% das micobactérias da amostra enquanto o método de Petroff elimina de 60 a 70% (KENT; KUBICA, 1985).

O processo consiste na adição de NALC-NaOH no mesmo volume da amostra, sendo misturados e deixados em repouso por 15 minutos. Em seguida, os tubos são completados até 50 ml utilizando Solução Tampão Fosfato pH 6,8. Essa solução é capaz de neutralizar até 5 ml de amostra, portanto, as amostras que ultrapassam esse valor devem ser divididas. Após o tamponamento, é feita a centrifugação a 3000 xg por 15 minutos. O sobrenadante é descartado e o *pellet* formado deve ser ressuspenso (BRASIL, 2008).

Para a ressusensão do *pellet* formado foi utilizada uma solução de Glicerol 10% (v/v) para melhor preservação dos bacilos durante o congelamento (TURAPOV et al., 2016). A solução foi adicionada na mesma quantidade do volume inicial da amostra, com exceção para aquelas inferiores a 2,5 ml, que foram reconstituídas para esse volume mínimo. O volume inicial e final de cada amostra foi anotado para posteriores correções.

Foi adicionada uma etapa extra de fluidificação utilizando um sistema com agulha 23G acoplada a uma seringa de 10 ml (técnica adaptada de Turapov e colaboradores (2016)) para obtermos alíquotas homogêneas (Fig. 6). Para evitar a formação de aerossóis dentro da Cabine de Segurança Biológica (CSB), utilizamos tampas de tubos de centrífuga com um orifício central, apenas para a passagem da seringa. O *pellet* reconstituído foi sugado e devolvido ao recipiente cinco vezes e em seguida acondicionado em tubos criogênicos em alíquotas de 0,550 ml. As alíquotas foram armazenadas a -70°C até a utilização para as etapas seguintes.

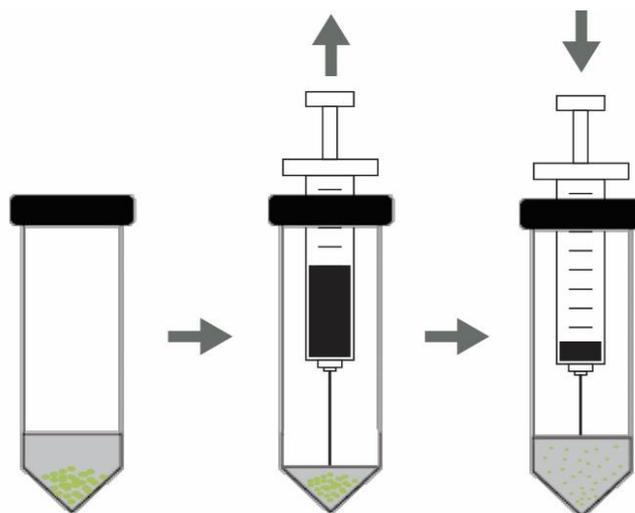


Figura 6 – Fluidificação das amostras com o sistema de agulha 23G. A figura ilustra que a amostra fica mais homogênea à medida que passa pela agulha, desfazendo os grumos.

As amostras foram descongeladas no momento de utilização para os testes. Antes de serem inoculadas ao meio de cultura, foi adicionada uma etapa de lavagem conforme descrito no item 5.5.4. A etapa teve como objetivo diminuir os possíveis fatores inibidores presentes no escarro (TURAPOV et al., 2016) e retirar a solução de Glicerol 10% utilizada para o congelamento.

5.5.4 Teste de diminuição dos fatores inibidores presentes no escarro

Para diminuir os fatores inibidores presentes no escarro citados por Turapov e colaboradores (2016) como possíveis causadores de inconsistências nos resultados de NMP e contagem de UFC/ml em meio sólido, um teste utilizando cinco amostras de escarro previamente descontaminadas e congeladas foi proposto.

A etapa de lavagem consistiu em centrifugar as alíquotas descongeladas a 4000xg por 20 minutos, descartar o sobrenadante e reconstituir *pellet* com meio 7H9 suplementado com 10% de OADC seguindo as orientações de Turapov e colaboradores (2016).

Para cada amostra foram realizadas duas placas para o cálculo do NMP, sendo uma da amostra logo após descongelada e a outra após o processo de lavagem. O ensaio para o cálculo do NMP foi feito como descrito no item 5.5.2.

Outra etapa que poderia alterar os fatores inibidores presentes no escarro é o congelamento, também sugerido por Turapov e colaboradores (2016). Para isso, foi

realizado o teste de Cálculo do Número Mais Provável (NMP), descrito no item 5.5.2, antes do congelamento de quatro das amostras arroladas para o projeto para comparar os resultados com o NMP após descongelar e verificar a interferência dessa etapa nas populações de MTB.

5.5.5 Obtenção das populações total e metabolicamente ativa de MTB

5.5.5.1 Método direto

Para padronizar uma cultura que representasse a população total de MTB e que permitisse a realização do TSA posteriormente de forma direta, avaliamos as possibilidades de composição (meios de cultura) e sistema de detecção de crescimento em tubo utilizando cinco amostras sabidamente positivas para MTB. A Figura 7 representa o fluxograma dos testes realizados. Além do meio de cultura, todos os tubos receberam 0,8 ml de antibióticos PANTA™ para conter possíveis contaminações. Por meio desse experimento, conseguimos ainda verificar se a composição do meio de cultura interfere no tempo até a positividade do tubo no sistema automatizado.

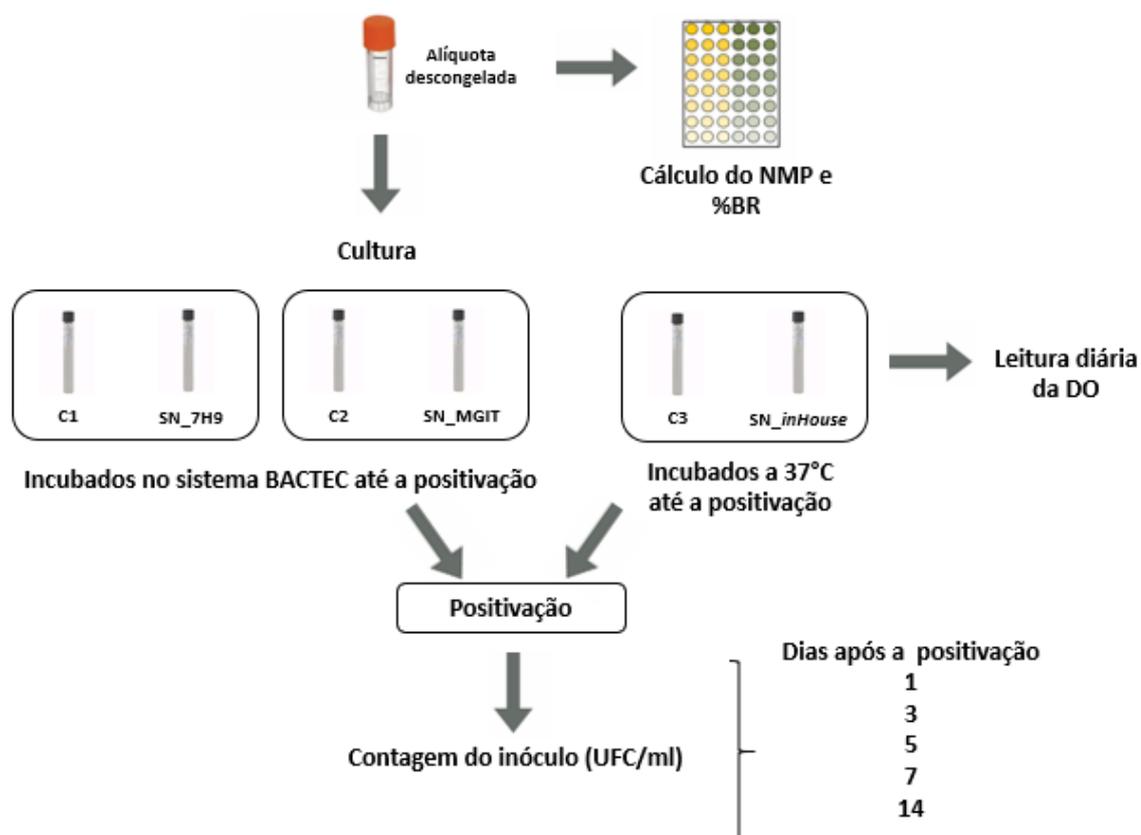


Figura 7 – Esquema da padronização do meio de cultura para obtenção da população total de MTB. C1: tubo contendo meio 7H9; SN_7H9: sobrenadante de cultura ressuspensão em meio 7H9; C2: meio de cultura original BD™ BBL™ MGIT™; SN_MGIT: sobrenadante de cultura ressuspensão com meio de cultura original; C3 meio de cultura análogo ao C1 e SN_ *in House* análogo ao SN_7H9 em tubos de vidro. DO: Densidade Ótica. NMP: Número Mais Provável. %BR: Taxa de Bacilos Ressuscitáveis.

Inicialmente as alíquotas das amostras foram descongeladas e submetidas à um processo de lavagem que consistiu em centrifugação por 4000xg por 20 minutos, com posterior descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* utilizando meio de cultura Middlebrook 7H9. Em seguida, foi inoculado 0,5 ml da amostra em cada um dos tubos de teste descritos acima. Os meios de cultura C1, SN_7H9, C2 e SN_MGIT foram colocados em tubos BD™ BBL™ MGIT™ e incubados no sistema BACTEC™ MGIT™ 960 até o dia da positivação. As culturas foram submetidas a diluições seriadas para a contagem de UFC/ml (Unidades Formadoras de Colônias) nos dias 1, 3, 5, 7 e 14 após a positivação (o dia de positivação foi considerado dia “zero”).

Os meios de cultura C3 e SN_ *in House* foram colocados em tubos de vidro com tampa de rosca e incubados a 37°C. Diariamente foi feita a leitura da DO_{625nm}. Para esses tubos, os dias 1, 3, 5, 7 e 14 foram considerados de acordo com os tubos análogos incubados no sistema BACTEC™ MGIT™ 960. Nos dias em questão, também foram feitas diluições para a contagem de UFC/ml.

5.5.5.2 Método indireto

De acordo com as limitações do método direto de obtenção das populações, foi proposto também um método indireto de isolamento para posterior TSA. Nesse modelo, a obtenção das populações foi feita na placa de 48 poços utilizada para o cálculo do NMP conforme descrito no item 5.5.2.

A população total foi obtida utilizando os crescimentos visualizados nos poços da placa que continham o SN após 14 dias de inoculação da amostra. Nesse dia, foram retirados 100 µl do poço N (Neat) (caso não fosse constatada contaminação) e semeados em meio de cultura sólido a base de ovo Ogawa-Kudoh (Fig. 8.A). Em caso de contaminação foi utilizado o crescimento do poço seguinte diluído.

Para a obtenção da população metabolicamente ativa foi utilizado o crescimento em meio sólido 7H11 após 14 dias de crescimento. Para isso, foram coletadas as

colônias crescidas e colocadas em um tubo com 1 ml de água estéril e pérolas de vidro, agitando em agitador mecânico por 30 segundos para desfazer os grumos formados. Em seguida foram inoculados 100 μ l da suspensão em meio de cultura Ogawa-Kudoh (Fig. 8.B).

Os meios de cultura sólido foram incubados a 37°C por 21 dias para a realização do TSA.

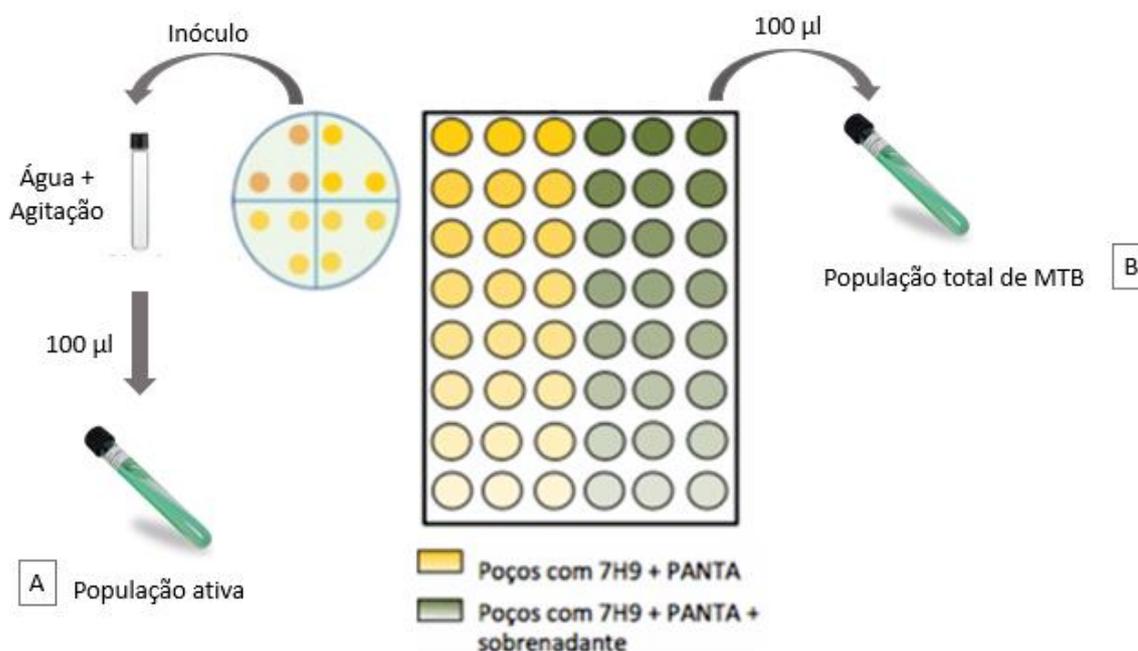


Figura 8 - Modelo esquemático do método indireto. Esquema A= População ativa; Esquema B= População total.

5.5.6 Exposição da amostra ao sobrenadante de cultura líquida de MTB

O meio de cultura que apresentou melhores resultados na etapa de padronização pelo método direto foi usado como referência na determinação do tempo mínimo necessário de exposição da amostra ao sobrenadante de cultura líquida de MTB para se obter a maior taxa de bacilos ressuscitáveis (%BR). Esse tempo foi calculado considerando o dia de incubação da amostra que apresentou maior %BR utilizando os valores UFC/ml obtidos do tubo contendo SN e o seu tubo controle.

5.5.7 Padronização do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos pelo método de Microdiluição em Caldo

A padronização do TSA foi feita seguindo as recomendações dos manuais do CLSI (do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*). Inicialmente foi preparada uma solução estoque de cada antimicrobiano com concentração 40 vezes maior do que a maior diluição da placa, com exceção para a Isoniazida (preparada 400 vezes) e para a Bedaquilina e Pirazinamida (8 vezes apenas, devido à baixa solubilidade). O Anexo A apresenta os antimicrobianos com suas respectivas informações e o preparo da solução estoque. Os antimicrobianos dissolvidos em água foram filtrados utilizando sistema de filtração 0,22 µm. Todos os antimicrobianos utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich®, com exceção da Bedaquilina que foi adquirida da Santa Cruz Biotechnology®. As soluções estoque preparadas foram alíquotadas e armazenadas a -70°C por até seis meses.

Para realizar a incorporação do antimicrobiano ao meio de cultura utilizado na placa de 96 poços (meio líquido 7H9 suplementado com 10% de OADC), foi preparada uma solução de trabalho de cada antimicrobiano fazendo as diluições necessárias de acordo com a concentração da solução estoque. Foi adicionado 0,1 ml de cada solução de trabalho nos respectivos poços da placa já preenchida com 0,1 ml do meio de cultura e foram seguidas as diluições.

O poço foi considerado positivo quando houve crescimento visível utilizando espelho para a visualização da placa.

5.5.7.1 Preparo do inóculo

Seguindo as orientações do CLSI (2018) o teste deve ser realizado utilizando um inóculo de aproximadamente 5×10^5 UFC/ml (aceitável entre 5×10^4 e 1×10^6 UFC/ml). Diante disso, foi preparado um inóculo em escala Mc Farland 1,0 utilizando cepa de referência H₃₇R_v e outras cepas de teste, seguindo com uma diluição na proporção de 1:5 para a incorporação no meio de cultura 7H9 e uma diluição na proporção de 1:10 para o preparo do inóculo. Para a contagem da UFC/ml foram feitas mais 3 diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e inoculadas em meio sólido 7H11. O teste piloto foi feito em triplicata em dias diferentes e cada novo lote de placas de TSA preparado foi testado com a cepa H₃₇R_v. Para validar o teste e o lote preparado foi necessário que os valores da

CIM de cada antimicrobiano estivessem de acordo com as referências para a cepa. Os valores para a cepa H₃₇R_v podem ser visualizados na Tabela 2, bem como as CC estabelecidas para cada antimicrobiano (CLSI, 2018; EVANGELOPOULOS et al., 2019; WHO, 2018; YU et al., 2018).

Tabela 2 - Valores para H₃₇R_v e Concentrações Críticas dos antimicrobianos.

Antimicrobiano	Concentração Crítica (CC) (µg/ml)	Concentração para H₃₇R_v (µg/ml)
Estreptomicina (S)	1	0,5 – 2,0
Isoniazida (I)	0,1	0,03 – 0,12
Rifampicina (R)	1	0,06 – 0,25
Etambutol (E)	5	0,25 – 2,0
Pirazinamida (PZA)	100	12,5*
Levofloxacina (Lfx)	1	0,12 – 1,0
Linezolida (Lzd)	1	0,25 – 2,0
Bedaquilina (Bdq)	1	0,015 – 0,06
Clofazimina (Cfz)	1	0,03 – 0,25
Cicloserina (Cs)	32	4 – 8
Amicacina (Amk)	1	0,25 – 2,0

Fonte: CLSI, 2018; EVANGELOPOULOS et al., 2019; WHO, 2018; YU et al., 2018.

* Valor de referência em pH 5,9.

5.5.7.2 Teste de toxicidade do dimetilsulfóxido (DMSO)

Como apresentado no Anexo A, o DMSO foi o diluente utilizado no preparo de várias soluções estoque, assim como a água. Para garantir que a quantidade utilizada não influenciasse nos valores obtidos no teste de sensibilidade, foi proposta a realização de uma placa apenas com DMSO para testar sua toxicidade. Foi testada também sua ação em pH (potencial hidrogeniônico) acidificado para representar o meio necessário à ação da Pirazinamida. A placa foi congelada a -70°C até a realização do teste.

Para a testagem da placa, foi descongelada inicialmente em temperatura ambiente, e em seguida adicionado 0,1 ml do inóculo da cepa H₃₇R_v previamente preparado. A placa foi incubada por 28 dias e o crescimento foi acompanhado.

5.5.7.3 Teste de ação da Pirazinamida em diferentes pHs

A Pirazinamida é um pró-farmaco que necessita de um meio acidificado para sua atuação (WAYNE, 2001). Para determinar qual o pH ideal para realizar o teste de sensibilidade utilizando a PZA, uma placa de teste com meio de cultura em diferentes pHs (5,3; 5,5; 5,7 e 5,9) foi proposta. A placa foi incubada por 28 dias e o crescimento foi acompanhado.

5.5.7.4 Modelo da placa de TSA

Um modelo de placa de TSA com 8 diluições foi proposto e compreende a testagem de 10 antimicrobianos em uma única placa de 96 poços (Fig. 9).

-	4	0,4	4	20	4	4	4	4	32	4	+
-	2	0,2	2	10	2	2	2	2	16	2	+
-	1	0,1	1	5	1	1	1	1	8	1	+
-	0,5	0,05	0,5	2,5	0,5	0,5	0,5	0,5	4	0,5	+
-	0,25	0,03	0,25	1,25	0,25	0,25	0,25	0,25	2	0,25	+
-	0,13	0,013	0,13	0,63	0,13	0,13	0,13	0,13	1	0,13	+
-	0,06	0,006	0,06	0,31	0,06	0,06	0,06	0,06	0,5	0,06	+
-	0,03	0,003	0,03	0,16	0,03	0,03	0,03	0,03	0,25	0,03	+
C-	S	I	R	E	Lfx	Lzd	Bdq	Cfz	Cs	Amk	C+

Figura 9 – Modelo esquemático da placa de TSA com 8 diluições. Os antimicrobianos são dispostos em colunas e as diluições seguem no sentido vertical, sendo que a maior diluição se apresenta na primeira linha. Nas extremidades esquerda e direita temos os controles negativo e positivo, respectivamente.

Foi adicionado 0,1 ml do inóculo nos poços de teste e controle positivo já contendo a mesma quantidade do meio de cultura. O crescimento foi acompanhado por até 21 dias conforme indicado pelo CLSI, sendo os dias 10 e 14 mais indicados para a verificação da CIM (CLSI, 2018).

5.5.7.5 Teste com cepas H₃₇R_a e Resistentes à Rifampicina, Isoniazida e Estreptomicina.

Seguindo os mesmos procedimentos realizados com a cepa H₃₇R_v foi testada também a placa de TSA com a cepa H₃₇R_a que não possui valores padronizados para o teste e cepas de referência resistentes (H₃₇R_v-RIF-R, H₃₇R_v-IHN-R) e um isolado de perfil conhecido resistente à Rifampicina, Isoniazida e Estreptomicina. Todos os testes foram feitos em triplicata em dias diferentes.

5.5.7.6 Comparação com o BACTEC™ MGIT™ 960 (padrão-ouro)

Das amostras utilizadas para o estudo, dez foram submetidas também ao TSA utilizando o sistema automatizado BACTEC™ MGIT™ 960, considerado padrão-ouro. Esse sistema permite apenas a obtenção de resultado como sensível ou resistente e não a CIM exata para o isolado em teste, como o método de microdiluição padronizado. Dos dez antimicrobianos da placa, 4 puderam ser comparados ao padrão-ouro (Estreptomicina, Isoniazida, Rifampicina e Etambutol).

5.5.8 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos a partir das populações ativa e total

O TSA foi realizado em 41 isolados utilizando o modelo de placa única contendo 10 antimicrobianos em 8 diluições padronizado. Os inóculos dos meios contendo a população total e metabolicamente ativa foram preparados como descrito para as cepas de referência no item 5.5.5.1, utilizando uma placa de TSA para cada população (ativa e total) obtidas pelo método indireto devido às limitações do método direto.

As leituras das placas foram feitas de 10 a 14 dias de crescimento comparando com os poços do controle positivo.

5.5.9 Testes com amostra de escarro contendo isolado de MTB resistente

Embora não seja um dos objetivos desse estudo, iniciamos uma investigação em uma nova população de pacientes em virtude dos resultados obtidos no estudo. Para isso, foi realizado cálculo do NMP e o TSA das populações total e ativa de uma amostra sabidamente resistente de paciente em tratamento.

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a realização das análises estatísticas utilizamos o Software IBM® SPSS Statistics e o grau de significância estatística considerado foi de 95% ($p \leq 0,05$). Os métodos de análise empregados para cada ensaio estão descritos a seguir:

- Realizamos a Análise de Variância para amostras pareadas para verificar diferença estatística entre o TTD (do inglês *Time to Detect*) dos meios de cultura e o melhor dia para a realização do TSA na etapa de padronização do método direto;
- O teste de Correlação de Pearson foi usado para avaliar a correlação entre a densidade ótica e a contagem de UFC/ml nos tubos com diferentes meios de cultura;
- Utilizamos o teste *t* de Student para amostras pareadas para comparar os meios de cultura com sobrenadante com seu respectivo controle na etapa de padronização do meio.
- Realizamos também a ANOVA, porém com teste de Friedman, seguido do test *post hoc* de Wilcoxon com correção de Bonferroni para todos os tubos de teste avaliando se havia diferença entre os meios de cultura quanto à contagem de UFC/ml;
- O teste *t* de Student para amostras pareadas também foi usado para verificar se houve diferença entre o processo de lavagem e não lavagem das amostras antes da realização do NMP e antes e após o congelamento das amostras;
- Para comparar se houve diferença estatística entre o isolamento de bacilos em meio com e sem sobrenadante de cultura líquida de MTB nas

placas de cálculo de NMP usamos o teste de Wilcoxon para amostras pareadas;

- O coeficiente Kappa foi utilizado para determinar a correlação entre os resultados de sensibilidade e resistência entre o método de microdiluição em caldo padronizado e o sistema automatizado BACTEC™ MGIT™ 960, considerado padrão-ouro;
- Para comparar os resultados da CIM de cada antimicrobiano entre as populações total e metabolicamente ativa utilizamos a Correlação de Spearman, e teste Kappa para verificar a concordância dos resultados. Ainda calculamos os valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ para observar a variação da CIM entre as cepas de teste. Além disso, a média geométrica foi usada para comparar as CIMs das populações ativa e total, por possuir melhor aplicabilidade em valores que variam exponencialmente (DAVIES, 1990; MANIKANDAN, 2011).
- Para correlacionar a %BR com os valores da CIM dos antimicrobianos utilizamos a correlação de Pearson;
- Cálculo do NMP foi feito em uma planilha cedida pela Universidade de Leicester, através da Doutora Galina V. Mukamolova.

Os gráficos foram feitos utilizando o Software GraphPad Prism, versão 9.1.2.

5.7 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e aprovado pelo Parecer nº 4.298.392.

A dispensa da utilização do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi justificada pelos seguintes motivos: i) as amostras somente foram selecionadas após finalizados todos os procedimentos de rotina e após liberação laboratorial, sem que houvesse intervenção no diagnóstico; ii) todos os dados foram manejados e analisados de forma anônima, sem identificação nominal dos participantes da pesquisa; iii) os resultados decorrentes do estudo serão apresentados de forma agregada, não permitindo a identificação individual dos participantes, e iv) se trata de um estudo não intervencionista (sem intervenções clínicas) e sem

alterações/influências na rotina/tratamento do participante de pesquisa, e consequentemente sem adição de riscos ou prejuízos ao bem-estar dos participantes.

Resultados

6. RESULTADOS

6.1 CÁLCULO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL DAS POPULAÇÕES TOTAL E ATIVA DE MTB

6.1.1 Amostras de escarro

Ao todo, 49 amostras de escarro de pacientes com tuberculose pulmonar foram submetidas ao teste de cálculo de NMP das populações total e ativa de MTB (Gráfico 1). Os resultados individuais de cada amostra (UFC, NMP, NMP_SN, TR, TI e %BR) são apresentados no Apêndice A juntamente com as informações de baciloscopia, cultura e identificação molecular.

A população total (NMP_SN) foi diferente estatisticamente da população ativa (UFC) por meio do teste de Wilcoxon para amostras pareadas ($p \leq 0,01$). Também foi verificada diferença entre a população ativa calculada a partir do NMP, embora esses valores não sejam levados em consideração, devido à alta taxa de inibição de crescimento.

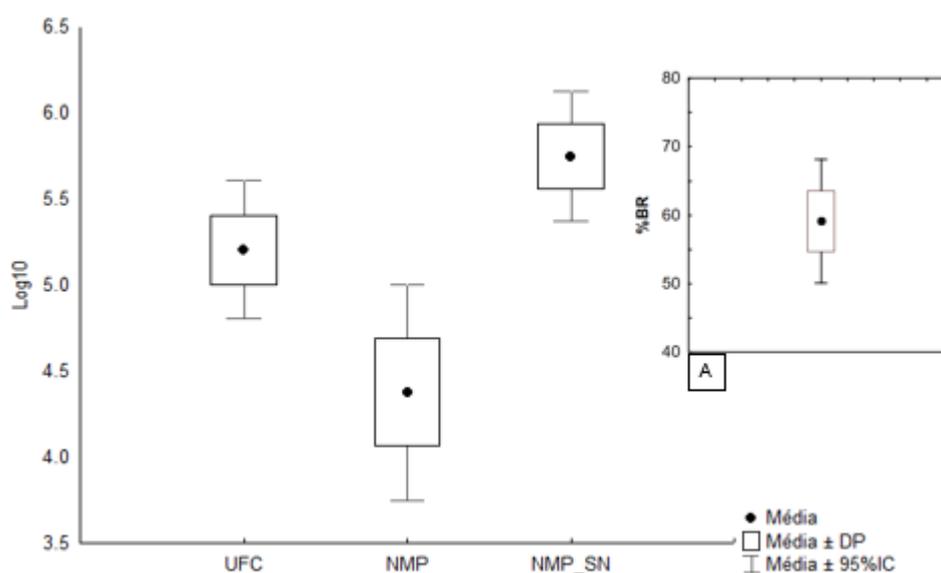


Gráfico 1 – Cálculo do UFC, NMP e NMP_SN das amostras e %BR. O eixo (y) indica o crescimento observado em Log₁₀ para UFC, NMP e NMP_SN (eixo x). O Gráfico A mostra a %BR das amostras do estudo.

A partir dos resultados das populações total e ativa calculamos a taxa de bacilos ressuscitáveis (%BR) para cada amostra (Gráfico 1.A). As amostras testadas tinham em média 60% de bacilos ressuscitáveis, com alta variação (de 0 a 100%). A média da taxa de ressuscitação (TR) foi de Log_{10} 0,51 e de inibição (TI) igual a Log_{10} -0,43.

6.1.2 Influência do uso de SN no crescimento de MTB

Para avaliarmos a influência do uso de sobrenadante de cultura líquida de MTB realizamos o cálculo do NMP com cepa de referência (possui apenas população ativa). Os resultados encontrados nas triplicatas são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados de NMP, NMP_SN e UFC/ml em triplicata para H₃₇Rv.

Método	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	Absoluto	Log_{10}	Absoluto	Log_{10}	Absoluto	Log_{10}
NMP	$8,5 \times 10^6$	$6,9 \pm 0,33$	$1,9 \times 10^7$	$7,3 \pm 0,32$	$8,5 \times 10^6$	$6,9 \pm 0,33$
NMP_SN	$8,5 \times 10^6$	$6,9 \pm 0,33$	$1,9 \times 10^7$	$7,3 \pm 0,32$	$8,5 \times 10^6$	$6,9 \pm 0,33$
UFC/ml	9×10^6	7,0	$7,6 \times 10^6$	6,9	$6,3 \times 10^6$	6,8

Legenda: NMP: Número Mais Provável calculado a partir da placa de 48 poços sem adição de sobrenadante. NMP_SN: Número Mais Provável calculado a partir da placa de 48 poços com adição de sobrenadante. UFC/ml: calculado a partir do crescimento em meio sólido.

Não observamos diferença significativa entre os valores de UFC/ml e NMP, como ocorre com as amostras de escarro e nem entre NMP e NMP_SN (teste de Wilcoxon para amostras pareadas) a partir do resultado final da placa (8 semanas). Porém, ao observarmos o crescimento semanal por meio da positividade dos poços, há uma positividade mais rápida dos poços com sobrenadante de cultura, tendendo a se igualarem na quarta semana de incubação (Gráfico 2).

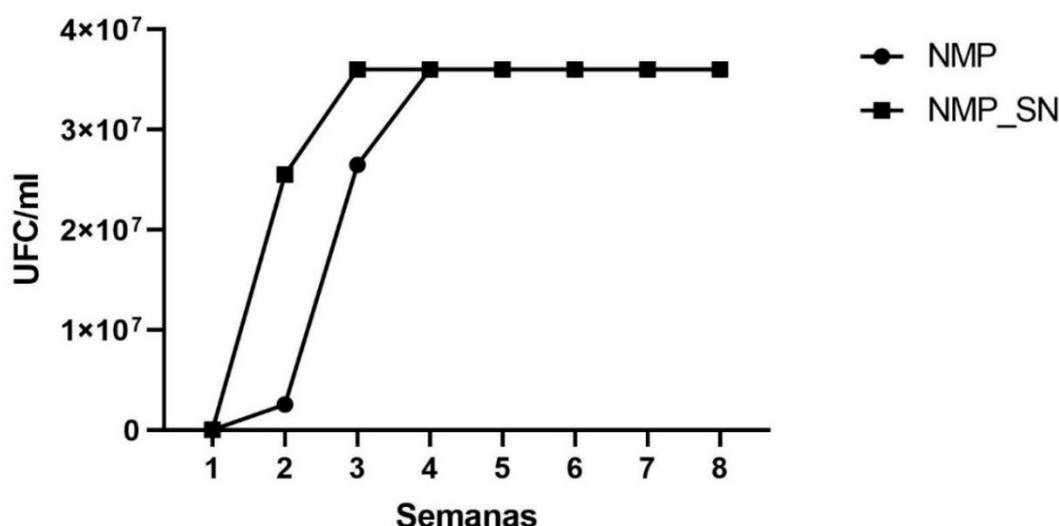


Gráfico 2 – NMP e NMP_SN calculados semanalmente a partir de cepa H₃₇R_v. O eixo (y) apresenta o crescimento de MTB e o eixo (x) indica as semanas de observação. NMP: Número Mais Provável calculado a partir da placa de 48 poços sem adição de sobrenadante. NMP_SN: Número Mais Provável calculado a partir da placa de 48 poços com adição de sobrenadante.

A Figura 10 apresenta um exemplo do resultado final da positividade dos poços da placa após as 8 semanas de acompanhamento mostrando resultados iguais nos dois meios testados.



Figura 10 – Resultado da leitura após 8 semanas de incubação de uma das placas de 48 poços a partir de cepa H₃₇R_v. Placa de 48 poços dividida ao meio, sendo que à esquerda são apresentados os poços contendo apenas o meio de cultura 7H9 (NMP) e à direita, os poços com adição de sobrenadante (NMP_SN).

6.2 DIMINUIÇÃO DOS FATORES INIBIDORES PRESENTES NO ESCARRO

6.2.1 Etapa de lavagem

A etapa de lavagem sugerida por Turapov e colaboradores (2016) para a diminuição de possíveis fatores inibidores presentes no escarro foi realizada com 5 amostras. O Gráfico 3 apresenta a recuperação de bacilos em \log_{10} para cada amostra antes e após lavagem (L) obtidos pela técnica de NMP.

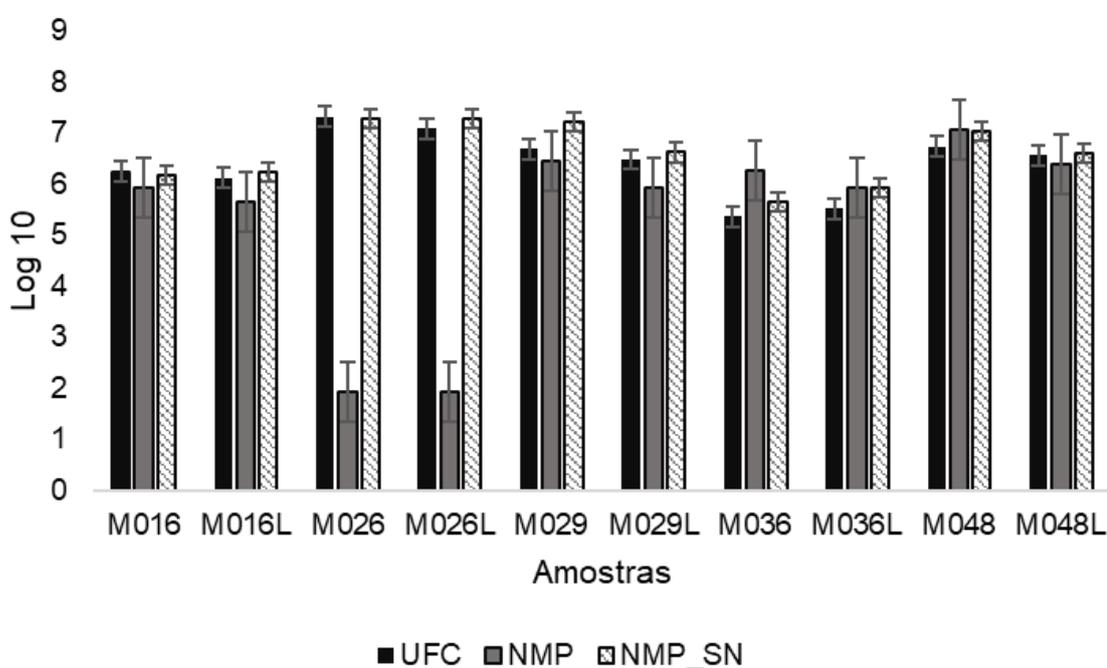


Gráfico 3 – Cálculo do NMP antes e após a lavagem das amostras. O eixo (y) indica o crescimento observado em Log_{10} para cada uma das amostras (eixo x) antes e após a lavagem (L).

Não houve diferença estatística entre os resultados antes e após a lavagem pelo teste *t* de Student para amostras pareadas em nenhum dos testes (UFC, NMP e NMP_SN).

Com relação à taxa de inibição (TI) as médias antes e após a lavagem foram próximas, -0,94 e -1,19, respectivamente. A taxa de ressuscitação (TR) também se aproximou, com média de 0,20 antes da lavagem e 0,18 após (valores apresentados em Log_{10} , conforme descritos no item 5.5.2).

6.2.2 Etapa de congelamento

Para avaliar o impacto do congelamento nas populações de MTB e nos fatores inibidores de crescimento, 4 amostras foram submetidas à técnica de NMP antes e após o congelamento (C) (Gráfico 4). Uma amostra apresentou contaminação, sendo descontinuada.

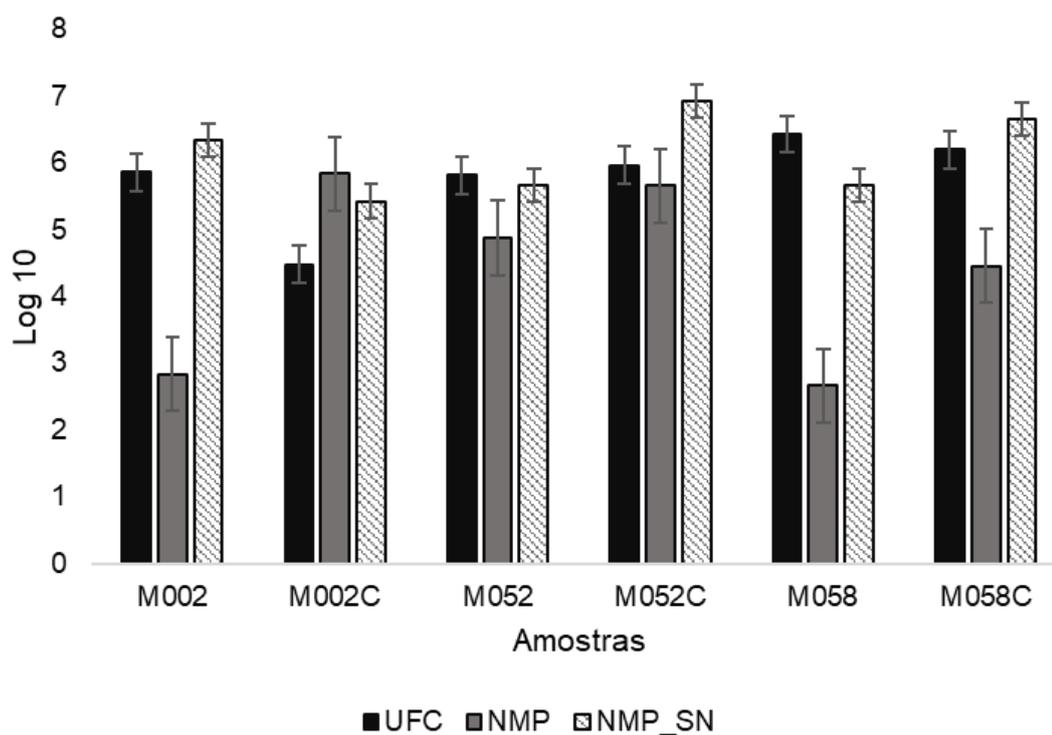


Gráfico 4 – Cálculo do NMP antes e após o congelamento das amostras. O eixo (y) indica o crescimento observado em Log_{10} para cada uma das amostras (eixo x) antes e após o congelamento (C).

Com relação à taxa de inibição (TI) a média antes do congelamento foi de -2,58, caindo para -0,23 após descongelar. A taxa de ressuscitação (TR) em contrapartida aumentou, de -0,14 para +0,79 após o congelamento. Não houve diferença estatística entre os resultados antes e após a lavagem pelo teste *t* de Student para amostras pareadas.

6.3 OBTENÇÃO DA POPULAÇÃO TOTAL DE MTB

Das cinco amostras utilizadas no teste, duas foram descontinuadas devido à contaminação de algum dos tubos o que impediria a comparação com os demais. Acreditamos que isso tenha ocorrido pela alta carga contaminante presente na amostra, que não pôde ser contida totalmente pelo método de descontaminação e pelos antimicrobianos adicionados ao meio de cultura. Diante disso, para alguns dos testes utilizamos resultados de apenas três amostras. Todas as amostras possuíam bacilos ressuscitáveis, mostrados pela técnica do cálculo de NMP. Tais resultados representam a padronização direta, já que o método indireto aqui descrito é a junção de técnicas já bem padronizadas.

6.3.1 TTD (Time to Detect) para os diferentes meios

Para avaliarmos se as diferentes composições dos meios de cultura interferem no TTD, comparamos os resultados obtidos pelo sistema BACTEC™ MGIT™ 960 para cada um dos meios utilizados. O Gráfico 5 apresenta o tempo médio necessário para a positividade por meio de crescimento.

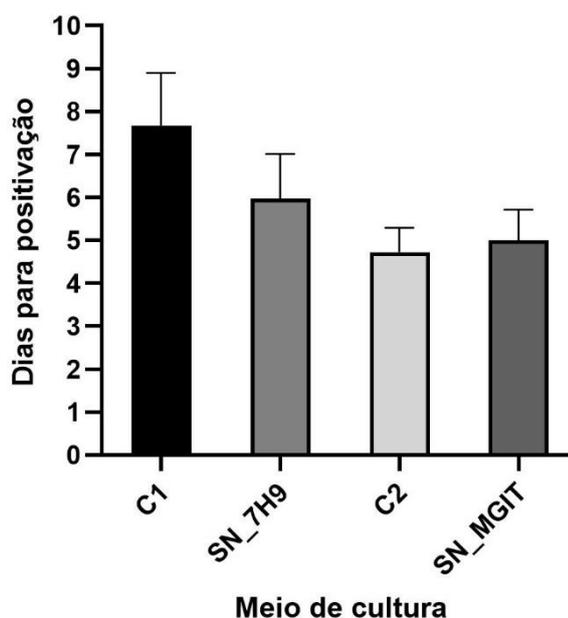
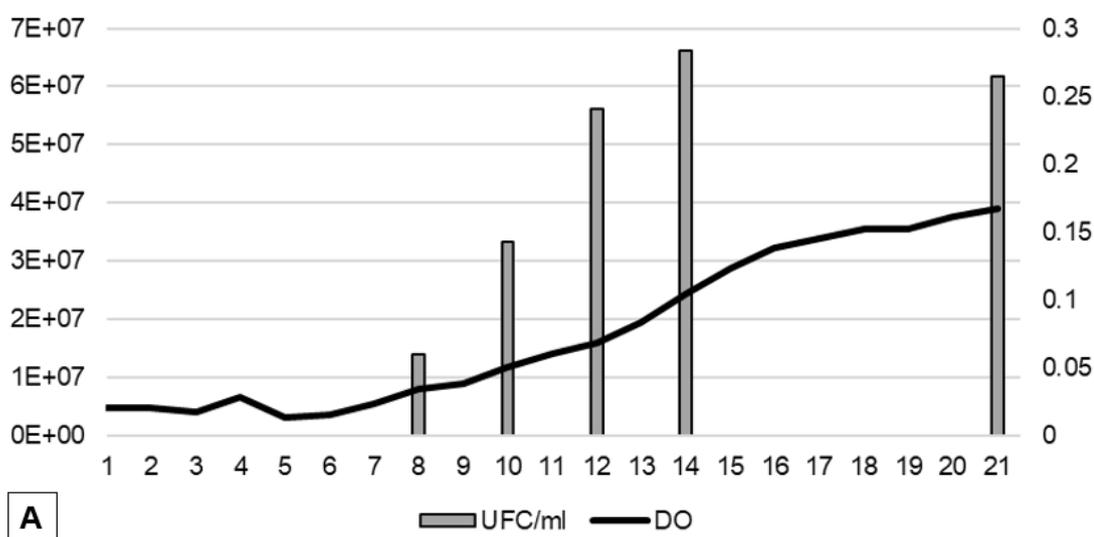


Gráfico 5 – TTD médio para cada meio de cultura testado na padronização dos meios. Eixo (y) representa os valores médios em dias de positividade e o eixo (x) cada meio de crescimento. As barras apresentam o intervalo de confiança de 95%.

O teste estatístico de Tukey revelou diferença estatística ($p \leq 0,05$) apenas dos tubos C2 e SN_MGIT com relação o tubo C1, havendo positividade média desses tubos de dois a três dias antes do tubo C1. O tubo com sobrenadante (SN_7H9) teve em média a redução de um dia e meio para a positividade quando comparado ao seu controle (C1) e não apresentou diferença estatística com relação aos meios do próprio sistema automatizado (C2 e SN_MGIT).

6.3.2 Densidade ótica (DO) e UFC/ml X Sistema BACTEC™ MGIT™ 960

Para verificar se a DO poderia ser utilizada como ferramenta de detecção de crescimento, os tubos C3 e SN-*in House* tiveram a DO_{625nm} medida durante 21 dias de crescimento e a contagem de UFC/ml foi feita em cinco pontos, sendo eles os dias 1, 3, 5, 7 e 14 após a positividade do seu tubo análogo inserido no BACTEC™ MGIT™ 960. Os Gráficos 6.A e 6.B apresentam a média da relação entre a DO_{625nm} medida e os valores de UFC/ml nas amostras nos tubos C3 e SN-*in House*, respectivamente.



A

UFC/ml — DO

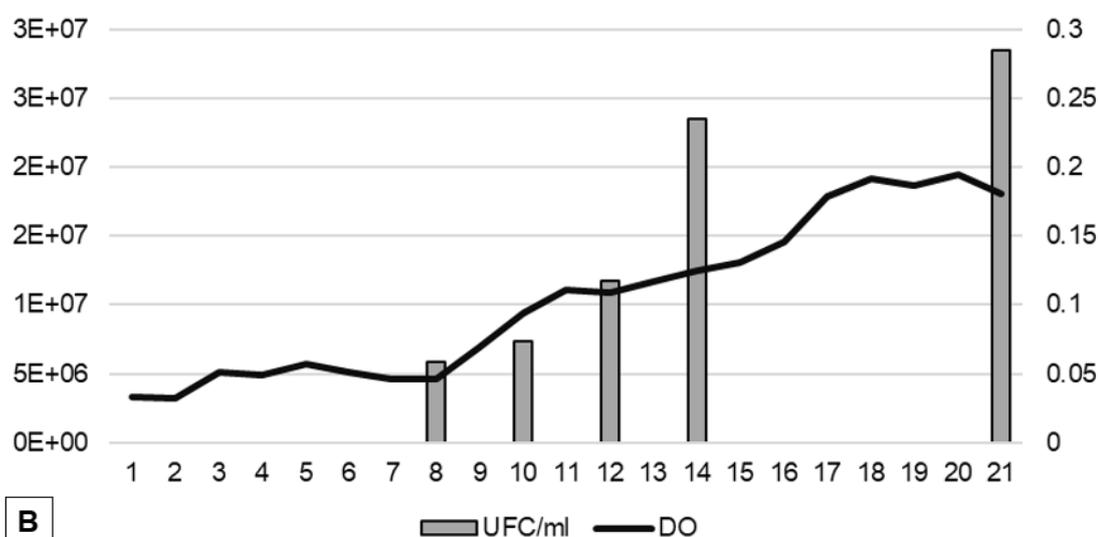


Gráfico 6 – Relação dos valores médios da DO_{625nm} e de UFC/ml nas amostras durante os dias de incubação. Gráfico A para os resultados do tubo C3 e B para o tubo SN_in House. As barras indicam os resultados de UFC/ml seguindo a referência de valores do eixo (y) à esquerda. A linha representa a leitura da densidade ótica seguindo a referência de valores do eixo (y) à direita. O eixo (x) indica os 21 dias de teste.

Não foi possível verificar uma correlação significativa ($p \leq 0,05$) em nenhum dos dois tubos. Para essa análise utilizamos a correlação de Pearson e excluímos os últimos 5 dias de teste, pois encontramos uma contaminação em um dos tubos que poderia alterar a DO.

Além disso, observamos que a contagem de UFC/ml já se apresenta alta mesmo sem que haja alteração na DO. Os tubos análogos inseridos no sistema BACTEC™ MGIT™ 960 tiveram média de positividade de 7 dias para o tubo C3, e 6 dias para o tubo SN_in House. Nesses dias, a DO dos tubos ainda permanecia estável, sem alteração significativa.

6.3.3 Determinação do melhor meio e método de ressuscitação e realização do TSA

Para determinarmos qual meio possui melhor ressuscitação da população dormente, utilizamos o teste t de Student para amostras pareadas para comparar o tubo com SN com o seu respectivo controle. Observamos diferença significativa entre o tubo SN_7H9 e seu controle C1 ($p=0,0001$) e entre o SN_MGIT e seu controle C2 ($p=0,04$).

Para verificarmos se existia diferença entre os 6 tubos de teste, realizamos a análise de variância através do Teste de Friedman, seguido pelo teste *post hoc* de Wilcoxon com correção de Bonferroni. Observamos que o tubo SN_7H9 apresentou diferença estatística de todos os outros cinco tubos em teste.

Os valores de UFC/ml encontrados nos tubos C2 e SN_MGIT variaram entre as amostras apresentando valores abaixo do necessário para a realização do TSA.

Para a determinação do melhor dia para a realização do TSA a partir da cultura, realizamos o teste de Tukey e encontramos diferença significativa entre o tubo com SN_7H9 e seu controle C1 do dia 3 ao dia 7 após a positivação pelo sistema BACTEC™ MGIT™ 960. Nesses dias, os valores de UFC/ml encontrados eram suficientes para a realização do TSA.

Quando realizados com todas as amostras arroladas para o estudo, verificamos alta taxa de contaminação dos tubos contendo sobrenadante (46%), enquanto nos tubos controle apenas 9% contaminou. Diante disso, utilizamos o método indireto para obter as populações e realizar o TSA posteriormente.

6.3.4 Tempo mínimo de exposição da amostra ao sobrenadante de cultura líquida de MTB

Para determinarmos o tempo mínimo de exposição da amostra ao SN, comparamos as %BR de cada meio de cultura contendo 7H9 acrescido de SN a partir da positivação pelo sistema automatizado (a partir do sétimo dia). Observamos o maior aumento no 10º dia de crescimento (Gráfico 7). De acordo com o teste *t* de Student para amostras pareadas, os valores de UFC/ml do dia 10 ao dia 14 de crescimento foram diferentes estatisticamente dos demais dias de teste ($p < 0,05$).

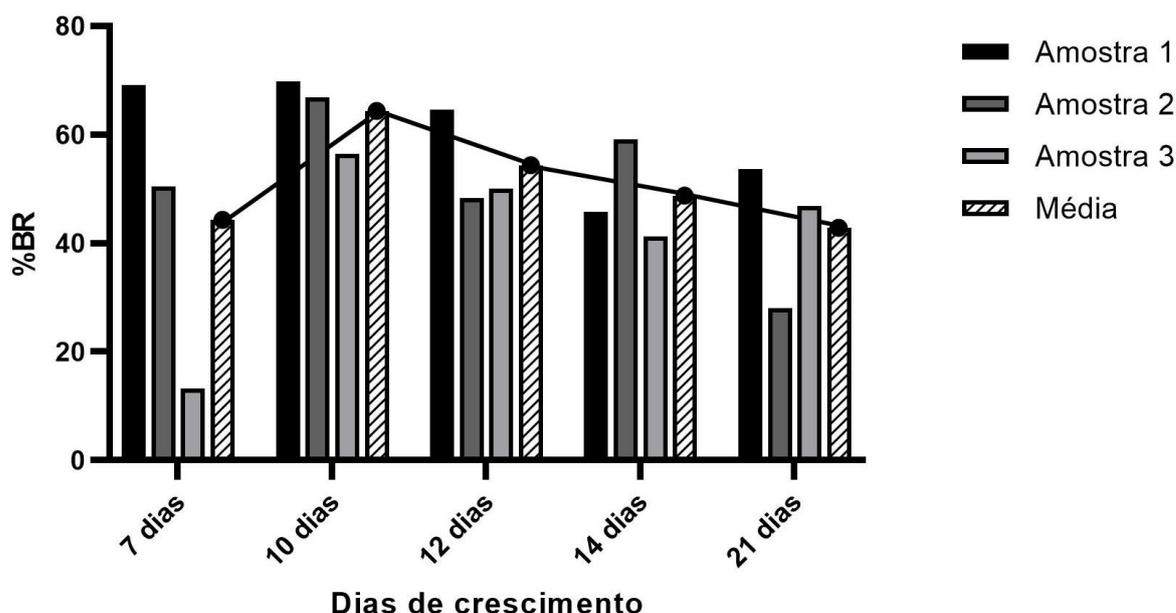


Gráfico 7 – Evolução da %BR das amostras em crescimento. O eixo (y) indica a %BR e o eixo (x) os dias de crescimento da cultura incubada para cada amostra e a média entre elas. A linha indica a oscilação da média da %BR nos dias de crescimento.

6.4 PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA) PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

6.4.1 Toxicidade do dimetilsulfóxido (DMSO)

No teste de toxicidade do DMSO para MTB observamos que a CIM foi de 6,25% (Fig. 11) para o meio 7H9 convencional. O meio acidificado (pH 5,9) não favoreceu o crescimento de MTB, com não homogeneidade entre as triplicatas e entre o controle positivo mesmo após 21 dias de crescimento.

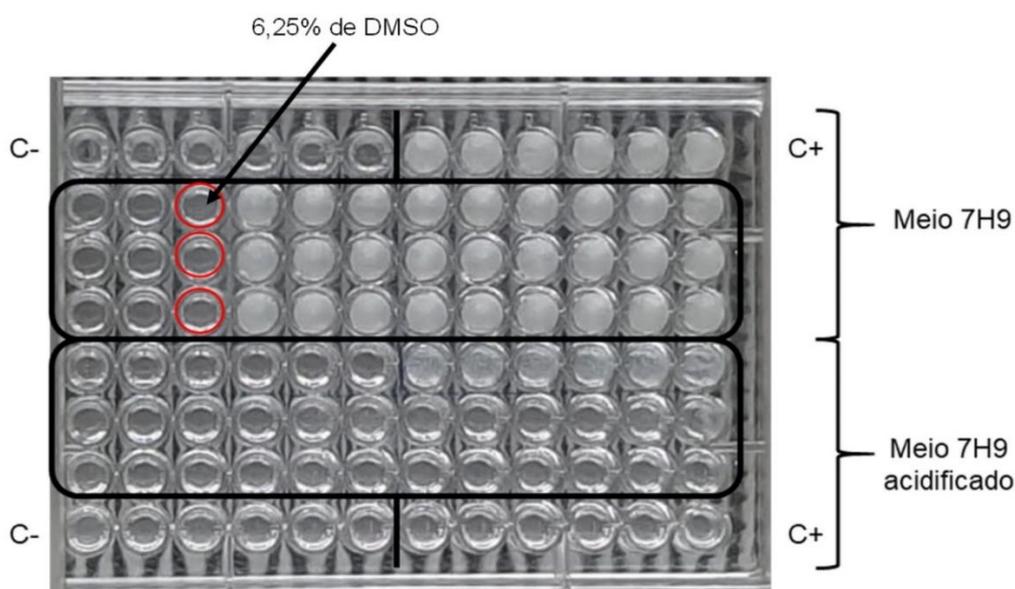


Figura 11 – Crescimento de MTB em diferentes concentrações de DMSO após 14 dias de incubação. Os círculos vermelhos indicam a menor concentração de DMSO capaz de inibir o crescimento de MTB.

As maiores concentrações dos antimicrobianos preparados com DMSO não atingem 6,25% do diluente em nenhum dos poços da placa de TSA, já que possui a concentração máxima de DMSO igual a 3,13%, e, portanto, não influencia no crescimento de MTB.

6.4.2 Ação da Pirazinamida em diferentes pHs

Dos quatro diferentes pHs testados, o que apresentou melhor atividade da PZA foi o pH 5,3, porém, com a CIM de 50 $\mu\text{g/ml}$, duas diluições acima da concentração desejada de 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Os demais pHs não possibilitaram a ação da PZA havendo crescimento em todas as diluições. O crescimento observado não foi homogêneo dificultando a visualização e determinação exata da CIM nas triplicatas. Nesse caso, a PZA não foi incluída na placa de TSA desse estudo.

6.4.3 Teste piloto com cepa H₃₇R_v

6.4.3.1 Modelo com 8 diluições de 10 antimicrobianos

A Tabela 4 apresenta os valores obtidos para H₃₇R_v em triplicata. A CIM foi considerada com a menor diluição em que não houve crescimento visível (Fig. 12).

Tabela 4 – Valores obtidos para H₃₇R_v em triplicata para cada antimicrobiano em teste.

Antimicrobianos	Valor de referência (µg/ml)	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
		(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
		DO _{625nm} =0,448 UFC/ml=1,3x10 ⁵	DO _{625nm} =0,448 UFC/ml=1,91x10 ⁵	DO _{625nm} =0,444 UFC/ml=1,11x10 ⁵
Estreptomicina	0,5 – 2,0	1,0	1,0	1,0
Isoniazida	0,03 – 0,12	0,05	0,03	0,05
Rifampicina	0,06 – 0,25	0,06	0,06	0,06
Etambutol	0,25 – 2,0	1,25	0,63	1,25
Levofloxacina	0,12 – 1,0	0,5	0,25	0,25
Linezolida	0,25 – 2,0	0,5	0,5	0,5
Bedaquilina	0,015 – 0,06	0,06	0,06	≤0.03 ^a
Clofazimina	0,03 – 0,25	0,25	0,25	0,25
Cicloserina	4 – 8	8,0	8,0	8,0
Amicacina	0,25 – 2,0	1,0	1,0	1,0

^a O valor mínimo aceito para a Bedaquilina está abaixo da menor concentração da placa.

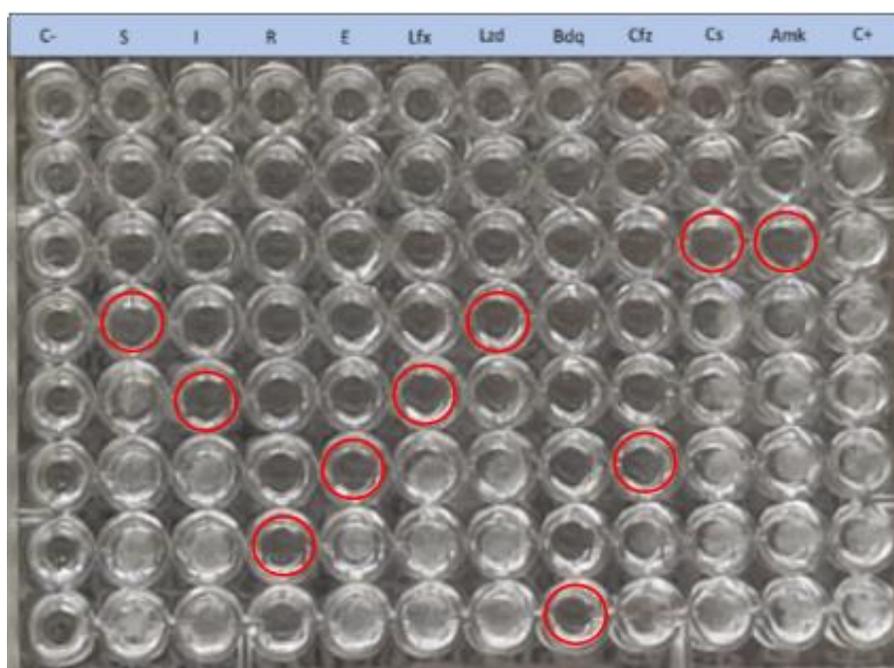


Figura 12 – Resultados obtidos para 10 dias de crescimento de MTB em uma das placas de teste com 8 diluições. Os círculos vermelhos indicam a CIM para cada antimicrobiano.

Todos os antimicrobianos tiveram seus resultados dentro dos valores esperados para a cepa referência.

6.4.4 Testes com cepas H₃₇R_a e Resistentes à Rifampicina, Isoniazida e Estreptomicina.

Testes adicionais foram feitos com cepa H₃₇R_a (Tabela 5) que não possui valores padronizados e com cepas e isolados com perfil de resistência conhecido para Isoniazida, Rifampicina e Estreptomicina.

Tabela 5 – Valores obtidos para H₃₇R_a para cada antimicrobiano em teste.

Antimicrobianos	Experimento 1 (µg/ml)	Experimento 2 (µg/ml)	Experimento 3 (µg/ml)	Experimento 4 (µg/ml) ^a
Estreptomicina	1,0	1,0	1,0	1,0
Isoniazida	0,03	0,03	0,03	0,03
Rifampicina	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03
Etambutol	0,63	0,63	0,63	0,63
Levofloxacina	0,25	0,25	0,25	0,25
Linezolida	0,5	0,5	0,5	0,5
Bedaquilina	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03
Clofazimina	0,06	0,06	0,06	0,06
Cicloserina	8,0	8,0	8,0	8,0
Amicacina	1,0	1,0	1,0	1,0

^a O quarto teste foi feito com um novo lote de placas.

Os valores exatos para Rifampicina e Bedaquilina não puderam ser obtidos na placa por serem inferiores à concentração mínima disponível.

As cepas resistentes cresceram em todas as diluições da placa, não sendo possível determinar a CIM exata.

6.4.4.1 Comparação com o MGIT (padrão-ouro)

Para avaliar a concordância da metodologia de TSA proposta utilizamos o sistema automatizado BACTEC MGIT 960 como referência na comparação dos resultados de sensibilidade e resistência de 10 isolados de MTB para 4 antimicrobianos (Estreptomicina, Isoniazida, Rifampicina e Etambutol). O coeficiente Kappa obtido foi igual a 1,0, considerado uma concordância perfeita dos resultados.

6.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PARTIR DAS POPULAÇÕES TOTAL E ATIVA

Das 55 amostras submetidas inicialmente para as análises, 41 tiveram crescimento suficiente e sem contaminação em alguma das etapas prévias à realização do TSA.

A tabela 6 apresenta a concordância da Concentração Mínima Inibitória (CIM) de cada antimicrobiano para os 41 isolados a partir das populações total e ativa, sendo essa última considerada como referência. No total, 5 antimicrobianos apresentaram 100% de concordância entre os resultados da CIM. Apesar disso, podemos observar que ocorreram 79 casos de aumento de uma diluição e 7 de duas diluições contra 26 e 1 caso de diminuição, respectivamente. Essa variação pode ser melhor observada no Gráfico 8.

Quatro amostras apresentaram resultados de CIM para a população total duas diluições acima dos resultados encontrados apenas com a população ativa. O acompanhamento das culturas durante o tratamento mostrou negativação após o segundo mês, embora os pacientes ainda estejam em tratamento.

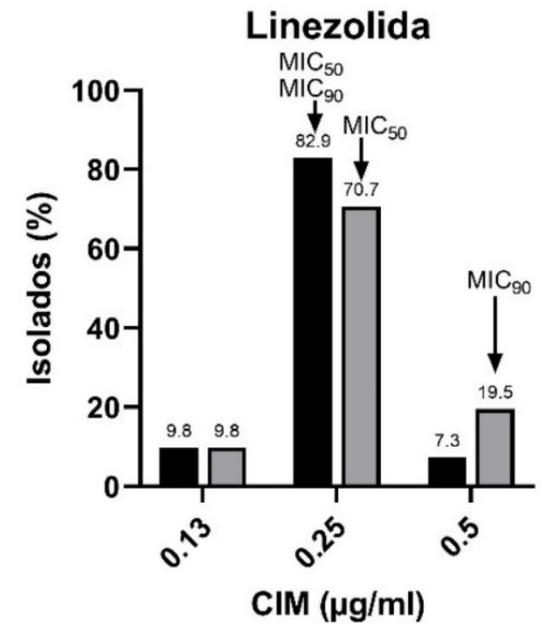
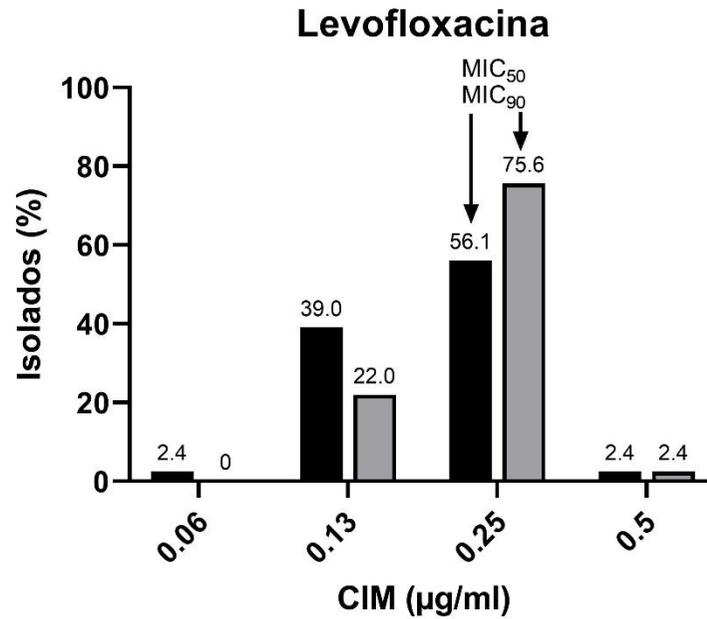
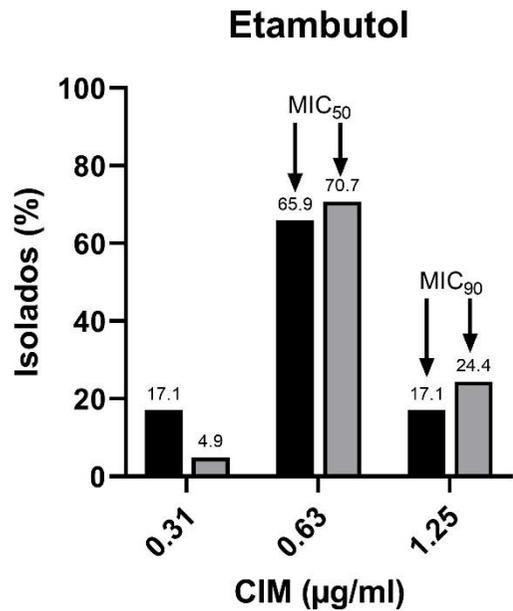
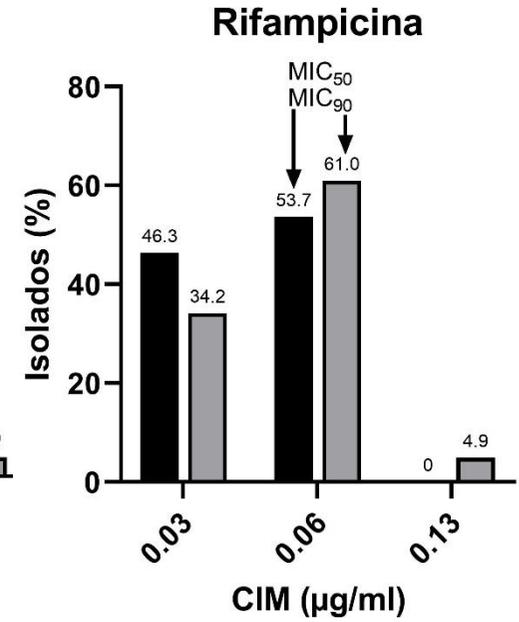
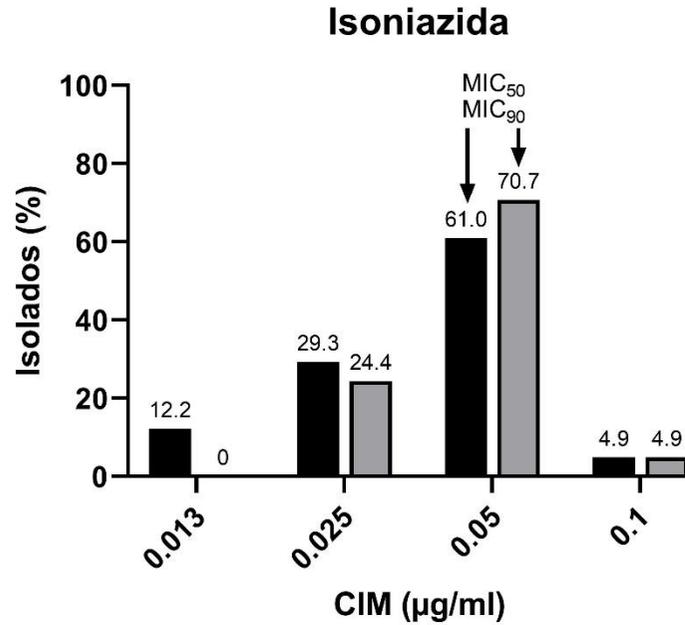
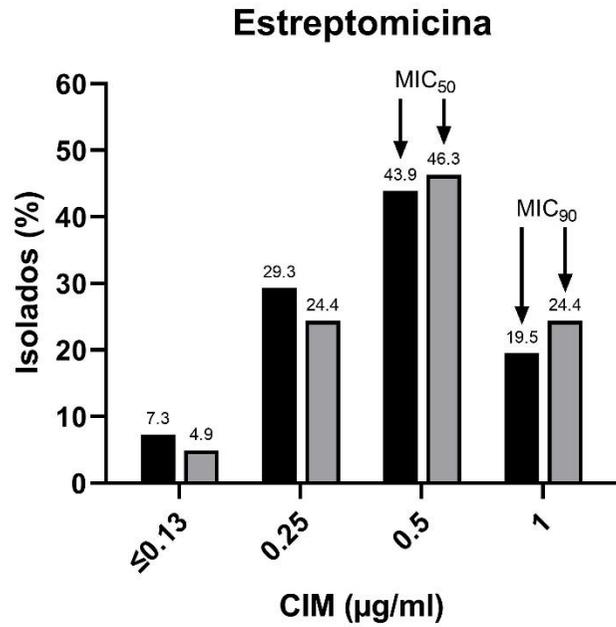
Tabela 6 – Análise de concordância dos resultados da CIM de cada antimicrobiano entre as populações ativa e total dos 41 isolados.

Antimicrobiano	<-2	-2	-1	Igual	+1	+2	>+2	% Concordância
Estreptomina	0	0	4	28	9	0	0	100
Isoniazida	0	0	4	28	9	0	0	100
Rifampicina	0	0	2	29	10	0	0	100
Etambutol	0	0	2	31	8	0	0	100
Levofloxacina	0	0	1	33	6	1	0	97,6
Linezolida	0	0	3	31	6	1	0	97,6
Bedaquilina	0	1	1	32	7	0	0	97,6
Clofazimina	0	0	5	21	11	4	0	90,2
Cicloserina	0	0	0	35	5	1	0	97,6
Amicacina	0	0	4	29	8	0	0	100
Total	0	1	26	-	79	7	0	-

Legenda: Concordância considerada como igual CIM ou ± 1 diluição.

A concordância pelo teste Kappa variou entre os antimicrobianos (Tabela 7), sendo a Isoniazida e a Clofazimina os que apresentaram menor concordância (0,32 e 0,322, respectivamente), sendo esse valor considerado como baixa concordância entre os resultados comparados. A correlação de Spearman também revelou variação entre os antimicrobianos, com menor correlação entre os resultados para a Linezolida (Tabela 7).

Quando realizamos o teste de sensibilidade com a população total de bacilos da amostra, observamos um incremento da CIM em todos os antimicrobianos testados, ou seja, nas maiores concentrações testadas em cada antimicrobiano, a população total está mais representada, enquanto a população ativa aparece mais em concentrações mais baixas. (Gráfico 8).



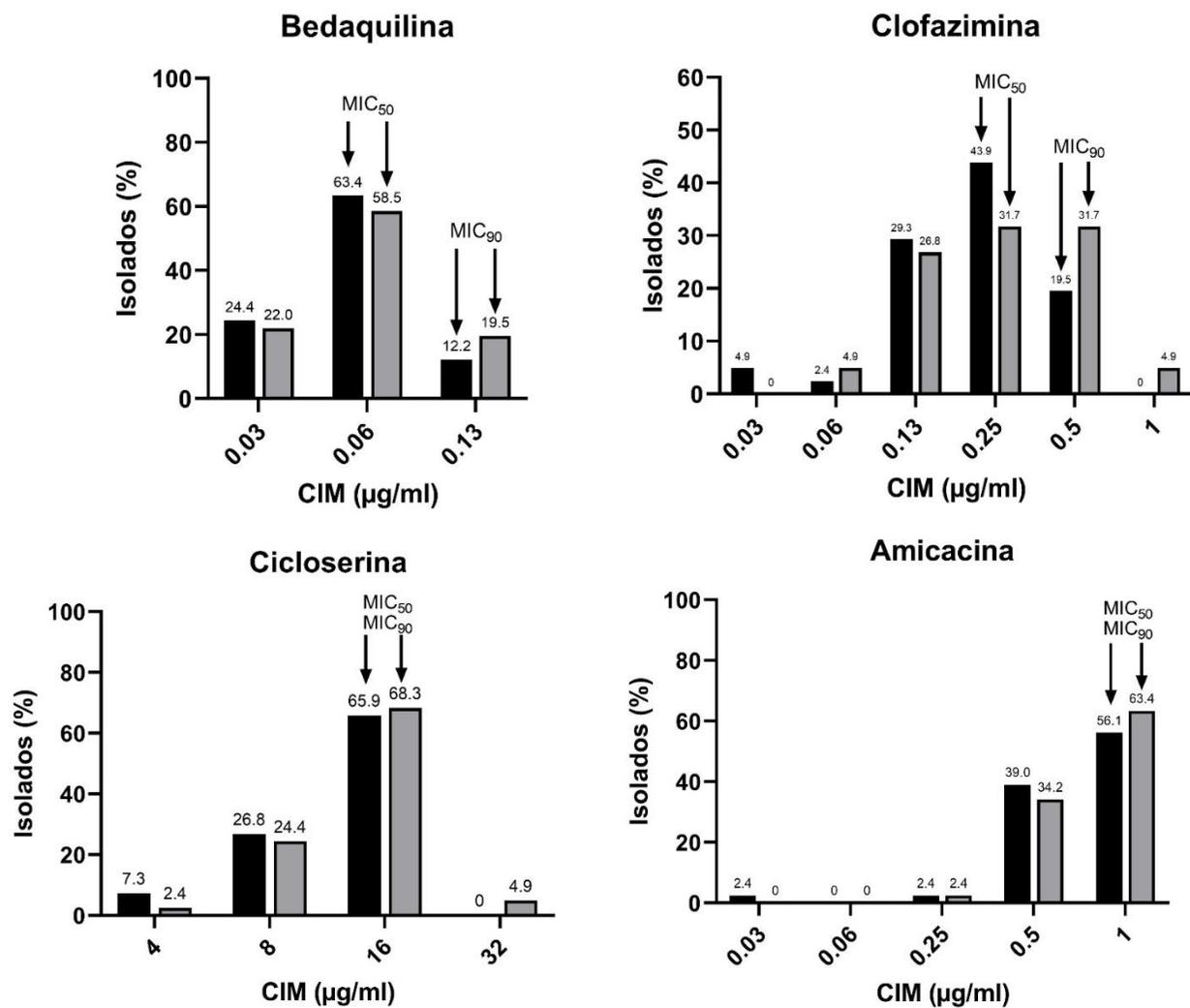


Gráfico 8 – Incremento da CIM dos antimicrobianos entre as populações total e ativa e MIC₅₀ e MIC₉₀. As barras em preto indicam a porcentagem de isolados da população ativa e em cinza a população total que apresentaram determinada CIM para cada antimicrobiano.

Tabela 7 – Média geométrica, teste Kappa e correlação da CIM das populações total e ativa para cada antimicrobiano.

Antimicrobiano	Média ($\mu\text{g/ml}$)		Kappa	Correlação
	Ativa	Total		
Estreptomicina	0,41	0,47	0,53	0,72**
Isoniazida	0,04	0,05	0,32	0,529**
Rifampicina	0,04	0,05	0,479	0,579**
Etambutol	0,63	0,72	0,396	0,57**
Levofloxacina	0,19	0,22	0,502	0,534**
Linezolida	0,25	0,27	0,374	0,334*
Bedaquilina	0,06	0,06	0,602	0,638**
Clofazimina	0,21	0,26	0,322	0,711**
Cicloserina	12,00	13,51	0,697	0,790**
Amicacina	0,68	0,76	0,427	0,496**

Legenda: Média geométrica. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Com relação à Concentração Inibitória Mínima de 50% da população e 90% (MIC_{50} e MIC_{90} , respectivamente), sofreram, em geral, pouca variação, sendo essa de no máximo uma diluição (Gráfico 8). Apenas a Linezolida apresentou valor de MIC_{50} superior na população total com relação à ativa.

A média geométrica da CIM de cada antimicrobiano foi próxima entre as populações, sendo que em todos os casos, os valores da população total foram superiores à ativa.

Não foi possível verificar correlação entre a taxa de bacilos ressuscitáveis (%BR) e maiores valores de CIM (correlação de Pearson).

6.6 AMOSTRA COM ISOLADO RESISTENTE DE PACIENTE EM TRATAMENTO

O cálculo do NMP revelou 60% de BR na amostra testada e o resultado das CIMs para cada antimicrobiano está demonstrada na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados da CIM de cada antimicrobiano das populações total e metabolicamente ativa da amostra com isolado resistente.

	Antimicrobiano	CC ($\mu\text{g/ml}$)	Resultado	
			Ativa	Total
S	Estreptomicina	1	0,5	2
I	Isoniazida	0,1	0,4	0,4
R	Rifampicina	1	0,06	0,06
E	Etambutol	5	1,25	1,25
Lfx	Levofloxacina	1	2	2
Lzd	Linezolida	1	0,5	0,5
Bdq	Bedaquilina	1	0,06	0,06
Cfz	Clofazimina	1	0,13	0,06
Cs	Cicloserina	32	8	16
Amk	Amicacina	1	0,5	0,5

Legenda – CC: Concentração Crítica.

As duas populações apresentam resistência à Isoniazida e Levofloxacina, porém, resistência à Estreptomicina foi visualizada apenas na população total.

Discussão

7 DISCUSSÃO

Recidiva em tuberculose é definida como casos em que o indivíduo tem um novo episódio de TB após ter sido classificado como clinicamente curado, a partir de amostras de escarro negativas (NAIDOO; DOOKIE, 2018). Em geral, a recidiva ocorre por fatores associados ao indivíduo, como infecção TB-HIV, principalmente, mas também pode ocorrer por outros diversos fatores como, resistência não detectada ou até mesmo infecção por cepas que têm uma maior propensão para resistência a medicamentos. E embora diversos estudos tenham tentado relacionar a recidiva com fatores pré-determinados, nem sempre é possível associar a ocorrência (NAIDOO; DOOKIE, 2018).

A presença de populações ocultas em amostras de pacientes de escarro, têm despertado a curiosidade de pesquisadores da área, principalmente devido à grande representação dessas populações no total de bactérias presentes (MUKAMOLOVA, 2010). Além disso, já foi mostrado que essas populações, além de possuírem *in vitro* maior tolerância aos antimicrobianos (TURAPOV, 2016), são capazes de persistir por mais tempo após o início do tratamento (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2020).

Essas evidências reforçam a necessidade de estudar essas subpopulações, principalmente porque, em geral, elas não aparecem nas metodologias convencionais de detecção do bacilo, por necessitarem de um meio apropriado para seu desenvolvimento (MUKAMOLOVA, 2010).

Qual a influência do sobrenadante de cultura líquida de MTB nas populações ativas?

Para observarmos a influência do sobrenadante de cultura líquida de MTB contendo RPF na população ativa de bacilos, nós propomos a realização do cálculo do NMP com cepa de referência H₃₇R_v a partir de um crescimento em meio sólido, ou seja, sem subpopulações ocultas, já que essas são provenientes de amostras de escarro de pacientes com TB pulmonar e não se multiplicam em meios sólidos (Mukamolova et al., 2010). Ao acompanharmos a positividade semanal dos poços, observamos que nas três primeiras semanas o NMP_SN se apresentou superior, igualando os valores com o NMP na quarta semana. Tais observações indicam que a presença do RPF e demais componentes no sobrenadante influenciam na velocidade

de crescimento de MTB, porém não alteram o resultado da leitura final (8 semanas) do NMP. Esse teste garante que a diferença de crescimento revelado pelo meio contendo sobrenadante de cultura líquida de MTB representa de fato uma população oculta.

É importante enfatizar ainda a similaridade dos valores encontrados entre a UFC/ml e o NMP, indicando ausência da inibição visualizada frequentemente quando o teste é feito a partir de amostras e escarro (MUKAMOLOVA et al., 2010; TURAPOV et al., 2016).

As etapas de lavagem e congelamento das amostras de escarro podem diminuir os fatores inibidores de crescimento presentes?

Mukamolova e colaboradores (2010) observaram uma diferença significativa entre os crescimentos em meio sólido e os valores de NMP encontrados em meio líquido sem adição de sobrenadante de cultura líquida de MTB, sendo que esses últimos valores encontravam-se, na maioria das vezes, inferiores aos do meio sólido. Diante desses resultados, surgiu a hipótese de que havia algum fator no escarro, que em meio líquido inibia o crescimento de MTB. Mais tarde, Turapov e colaboradores (2016) adicionaram aos seus experimentos uma etapa de congelamento das amostras após descontaminadas, seguida de centrifugação/lavagem antes de inocular as amostras para contagem das populações, mostrando uma possível diminuição desses fatores inibidores de crescimento. Diante disso, propomos a realização do congelamento e das lavagens separadamente para avaliar a diminuição da inibição. Não encontramos diferença estatística entre as amostras antes e após congelamento e antes e após a lavagem, porém em alguns casos, os processos pareceram aumentar a recuperação de bacilos. Levando em consideração a taxa de inibição (TI) das amostras, observamos uma redução média para $\text{Log}_{10}-0,23$ após o congelamento, sendo que antes de era de $\text{Log}_{10}-2,58$. A taxa de ressuscitação (TR) em contrapartida aumentou, de $\text{Log}_{10}-0,14$ para $\text{Log}_{10}+0,79$ após o congelamento, indicando maior capacidade de ressuscitar a população oculta. Dessa forma, a etapa de congelamento parece ser capaz de auxiliar na diminuição dos fatores inibidores presentes no escarro, porém não é capaz de eliminar. Para as amostras testadas para todo o estudo, tanto a lavagem como o congelamento foram realizados e obtivemos uma média de $\text{Log}_{10}-0,43$ de TI. Comparamos com a média de inibição encontrada por

Mukamolova e colaboradores (2010), que foi quase duas vezes maior ($\text{Log}_{10} -0,81$). Acreditamos que essa diminuição seja devido às etapas que adicionamos seguindo Turapov e colaboradores (2016), já que Mukamolova e colaboradores (2010) não realizaram nenhuma das duas etapas.

Qual o melhor meio de cultura líquida para a obtenção das populações ativa e total pelo método direto?

Para definirmos o melhor meio líquido para a obtenção das populações por um método direto, que possibilitasse a realização do TSA posteriormente, nós propomos uma comparação entre diferentes meios e formas de detecção do bacilo. Os resultados mostraram que o meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 acrescido de sobrenadante de cultura líquida de MTB foi superior aos demais testados com relação à recuperação de bacilos ressuscitáveis e com concentração bacteriana suficiente para a realização do TSA de forma direta. Apesar de ter apresentado diferença estatística com relação ao seu controle, o tubo contendo meio de cultura do próprio sistema automatizado acrescido de sobrenadante apresentou valores baixos de UFC/ml impossibilitando a realização do TSA já que o inóculo na placa deve ser próximo de 5×10^5 UFC/ml.

Ao compararmos o meio acrescido de sobrenadante de cultura líquida de MTB com um meio controle, considerado convencional, nós ganhamos em média 1,5 dias no tempo de positivação (TTD) dos tubos no sistema automatizado. Mostramos que, por essa metodologia, é possível realizar o TSA de 3 a 7 dias após a positivação de forma direta, ou seja, apenas ajustando a concentração de bactérias e inoculando nas placas com antimicrobiano.

Nós ainda avaliamos a possibilidade de utilizar a densidade ótica para detectar o crescimento, porém observamos que apesar de já ter atingido concentrações bacterianas suficientes para a realização do TSA, as alterações de turbidez demoram a ser detectadas, sendo inferiores ao sistema automatizado.

Qual o método mais indicado para o isolamento das populações para posterior realização do TSA?

Apesar dos resultados promissores pelo método direto, este possui limitações quanto ao uso, considerando a alta taxa de contaminação observada (46% contra 9% do controle). Acreditamos que isso tenha ocorrido pela alta carga de contaminantes nas amostras de escarro que pode ser favorecida também pela presença dos componentes do filtrado de cultura, dificultando que os antimicrobianos presentes no meio sejam capazes de conter a contaminação. A produção e utilização de RPF também tem sido observada para microrganismos distintos (TELKOV et al., 2006; PUSPITA et al., 2013), reforçando a hipótese de que influenciem no melhor desenvolvimento das populações contaminantes. Diante disso, optamos por utilizar a metodologia indireta descrita no item 5.5.5.2, que apresentou taxa de contaminação inferior (14%), permitindo a realização do TSA a partir da cultura pura, com menos perdas no número de amostras e utilizando metodologias já bem padronizadas de ressuscitação e crescimento. É importante ressaltar que o método direto apresentado mostrou bons resultados na obtenção das populações de MTB e pode ser utilizado caso seja possível contornar as limitações aqui apresentadas.

Quanto tempo é necessário expor a amostra de escarro ao sobrenadante de cultura líquida de MTB para obter a maior taxa de bacilos ressuscitáveis?

Observamos que com 10 dias de crescimento a taxa de bacilos ressuscitáveis se apresenta com valores mais altos entre as amostras testadas. Os valores do meio com sobrenadante se diferem estatisticamente do seu tubo controle de 10 a 14 dias de crescimento.

O método de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos padronizado pode ser empregado para avaliar sensibilidade e resistência de MTB?

Embora não seja considerado o padrão-ouro na determinação de sensibilidade de MTB aos antimicrobianos, a técnica de microdiluição em caldo tem sido alvo de utilização devido à possibilidade de testagem de drogas de segunda linha e principalmente por ser um método semi-quantitativo, sendo possível determinar a CIM

e não apenas a sensibilidade ou resistência (KANIGA et al., 2016). Diante disso, o CLSI (2018) e a OMS (2018) têm lançado manuais com as recomendações para o desenvolvimento da técnica e os valores de referência baseados em estudos publicados até então. Para as drogas de segunda linha, ainda poucos são os estudos utilizados como referência, causando alterações frequentes nos valores de referência a cada manual atualizado. Para Cicloserina, por exemplo, não foi possível determinar uma concentração crítica (CC) e CIM para H₃₇R_v devido à escassez de estudos (WHO, 2018).

Neste estudo, dos antimicrobianos testados, a penas apenas a Pirazinamida não pode ser reproduzida devido à dificuldade de promover um meio acidificado ideal para a ação da droga, e portanto, não está presente na placa de TSA utilizada. Para todos os demais encontramos resultados para cepa de referência condizentes com os manuais do CLSI (2018) e OMS (2018). Os resultados da Cicloserina encontrados foram semelhantes ao estudo de Evangelopoulos e colaboradores (2019) e de Yu e colaboradores (2018).

Obtivemos os resultados esperados para os 10 antimicrobianos com relação à cepa de referência H₃₇R_v com valores já pré-estabelecidos e de resistência para cepas com perfil de sensibilidade já conhecido. Comparamos ainda a metodologia com o sistema automatizado BACTEC MGIT 960, considerado o padrão-ouro, e obtivemos uma concordância perfeita dos resultados (Kappa= 1,0). Utilizamos o DMSO como diluente de alguns antimicrobianos e mostramos que nenhuma das concentrações finais na placa eram tóxicas para MTB, não influenciando no resultado da CIM obtida. Apesar de ainda não possuir os valores padronizados para cada antimicrobiano, a cepa de referência H₃₇R_a (não virulenta) mostrou resultados promissores na validação dos lotes das placas de TSA, com resultados reprodutíveis e bem semelhantes aos da cepa virulenta, com exceção para a Bedaquilina e a Rifampicina, apresentando para estes, valores inferiores à mínima concentração na placa. A utilização de cepas não virulentas é encorajada sempre que possível para diminuir os riscos dos testes (XU; WANG; XU, 2020).

Existe diferença entre os resultados de TSA da população ativa e total a partir de uma mesma amostra de escarro?

As populações ativa e total de amostras de escarro de 41 pacientes diferentes foram submetidas ao TSA e os valores da CIM foram comparados entre as populações. Foi verificada concordância de no mínimo 90% entre os resultados das populações considerando valores iguais ou com ± 1 diluição. O teste Kappa mostrou que para alguns antimicrobianos, as variações encontradas indicam concordância razoável para Isoniazida, Etambutol, Linezolida e Clofazimina, e concordância moderada para Estreptomicina, Rifampicina, Levofloxacina e Amicacina. Apenas Bedaquilina e Cicloserina apresentaram uma concordância substancial. Além disso, ao compararmos as médias geométrica observamos que embora próximas, a população total sempre apresentou valores superiores aos encontrados na população ativa. Apesar de as CIMs de 50% e 90% da população se apresentarem semelhantes entre as populações, com exceção para a Linezolida, observamos um incremento na CIM da população total, ou seja, as maiores concentrações dos antimicrobianos apareceram com mais frequência nos testes com a população total. Embora esses mostrem uma tendência de CIMs maiores na população total, não são significantes estatisticamente. A presença de maiores taxas de bacilos resuscitáveis não teve correlação estatística com maiores CIMs.

Nesse estudo, avaliamos amostras de pacientes com tuberculose pulmonar que ainda não haviam iniciado o tratamento para a doença. Apenas um caso de paciente já em tratamento foi avaliado e mostrado nesse estudo como um caso separado. Para esse paciente, observamos que houve resistência a um dos antimicrobianos testados apenas no TSA a partir da população total. Diante disso, acreditamos que diferenças no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos entre as populações total e ativa podem ser mais frequentes em pacientes já em tratamento.

Estudar amostras de pacientes ainda não tratados foi importante para conhecermos o comportamento das diferentes populações de bacilos nesses casos. Esse estudo mostra a necessidade de investigar o comportamento dessas populações em outro grupo de pacientes, como os em tratamento.

Importância de avaliar a população total no diagnóstico e Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

Para que uma resistência seja detectada por um método fenotípico é necessário que uma população bacteriana representativa com a resistência esteja presente no teste, como no método das proporções por exemplo, que necessita de no mínimo 1% para determinar a resistência (CANETTI, 1963).

No presente estudo, a %BR encontrada chegou a 100% em alguns casos, com média de 60% entre as amostras testadas, sendo que em mais de 90% delas foi possível visualizar a presença dessas subpopulações.

Acreditamos que alguns casos de resistência podem estar presentes em populações ocultas, o que dificultaria que métodos convencionais fenotípicos detectassem essa resistência, já que essas subpopulações não são capazes de se desenvolverem nesses meios de cultura.

Limitações do estudo e o que ainda precisa ser feito

A metodologia direta padronizada para obtenção das populações total e ativa em tubos, embora promissora, apresentou limitações na sua utilização pela alta taxa de contaminação observada. Isso poderia ser reduzido com a assepsia bucal do paciente antes da coleta da amostra (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2020; PERES et al. 2011), e um método de descontaminação mais eficiente, já que a presença do RPF e demais componentes do SN parece favorecer também as bactérias contaminantes.

Acreditamos que abrangendo um número maior de pacientes poderíamos encontrar casos esporádicos de modificação do perfil de sensibilidade/resistência ao avaliarmos a população total de bacilos, mesmo em pacientes sem tratamento prévio. Além disso, incluímos apenas um caso de paciente em tratamento e seus resultados mostraram possíveis alterações nesse grupo de pacientes. Diante disso, um estudo com maior número e grupos diferentes poderia elucidar melhor tais questionamentos.

Conclusão

8. CONCLUSÃO

- 1) O uso do sobrenadante de cultura líquida de MTB não influencia na contagem da carga bacilar, apenas na velocidade de crescimento do bacilo;
- 2) A etapa de lavagem e o congelamento parece diminuir os fatores inibidores presentes no escarro, através da diminuição da taxa de inibição de crescimento após o congelamento das amostras, porém, não elimina;
- 3) A adição de sobrenadante de cultura líquida de MTB ao meio de crescimento, diminui o TTD em até 1,5 dias, equiparando-o com o meio padrão do sistema BACTEC MGIT 960;
- 4) O uso da Densidade Ótica como ferramenta de detecção de crescimento em cultura líquida é inferior ao sistema automatizado, já que alterações significativas só ocorrem tardiamente, mesmo com altos valores de UFC/ml;
- 5) O melhor meio líquido para a ressuscitação da população dormente e posterior realização do TSA foi o 7H9 suplementado com SN;
- 6) O método indireto foi superior ao método direto devido à menor taxa de contaminação;
- 7) O tempo mínimo de exposição da amostra ao SN de cultura líquida de MTB com uma maior taxa de BR foi de 10 dias de crescimento.
- 8) A presença de maior %BR não pode ser associada à maiores CIMs ds antimicrobianos de primeira e segunda linha no tratamento de TB pulmonar;
- 9) O TSA com a população total de bacilos embora apresente valores superiores de CIM em maior frequência não implica na alteração de sensibilidade e resistência na população de pacientes sem tratamento prévio para TB pulmonar;

10) O perfil de suscetibilidade da população total de bacilos comparada à população ativa do único caso de paciente em tratamento incluído nesse estudo, evidenciou padrões de sensibilidade/resistência possivelmente diferentes nessa população de pacientes, sugerindo a necessidade novos estudos envolvendo pacientes em tratamento, com suspeita de resistência, falha terapêutica ou recidiva.

Referências

9. REFERÊNCIAS

AHMAD, S. et al. Discordance across phenotypic and molecular methods for drug susceptibility testing of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in a low TB incidence country. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–16, 2016.

ALMEIDA JÚNIOR, P. S. et al. Differentially culturable tubercle bacteria dynamics during standard anti-tuberculosis treatment: A prospective cohort study. **Tuberculosis**, v. 124, 2020.

ALNIMR, A. M. Dormancy models for mycobacterium tuberculosis: A minireview. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 641–647, 2015.

ANTHONY, R. M. et al. Light emitting diodes for auramine O fluorescence microscopic screening of Mycobacterium tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 10, n. 9, p. 1060–1062, 2006.

ARDITO F. et al. Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) Automated System for Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4440–4444, 2001.

AZÉ, J. et al. Genomics and machine learning for taxonomy consensus: The mycobacterium tuberculosis complex paradigm. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–24, 2015.

BALABAN, N. Q. et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 441–448, 2019.

BAÑULS, A. L. et al. Mycobacterium tuberculosis: Ecology and evolution of a human bacterium. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1261–1269, 2015.

BLAKEMORE, R. et al. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 2495–2501, 2010.

BLOOM, B. R.; MURRAY, C. J. L. Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. **Science**, v. 257, n. 5073, p. 1055–1064, 1992.

BORGDORFF, M. W.; VAN SOOLINGEN, D. The re-emergence of tuberculosis: What have we learnt from molecular epidemiology? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 10, p. 889–901, 2013.

BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 320–330, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Brasília, 2008. 436 p.

_____. _____. _____. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Brasil Livre da Tuberculose: Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde**. Brasília, 2017. 52 p.

_____. _____. _____. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. 2. ed. Brasília, 2019. 364 p.

_____. _____. _____. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Boletim Epidemiológico de Tuberculose**. Brasília, 2020. 39 p.

CANETTI, G. et al. Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensitivity and Resistance. **Bull. Wld Hlth Org.**, v. 29, p. 565–578, 1963.

CAÑO-MUÑIZ, S. et al. New Approaches and Therapeutic Options for Mycobacterium. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 1–13, 2018.

CHAKRAVORTY, S. et al. Genotypic susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis isolates for amikacin and kanamycin resistance by use of a rapid sloppy molecular beacon-based assay identifies more cases of low-level drug resistance than phenotypic Lowenstein-Jensen testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 43–51, 2015.

CHANG, D. P. S.; GUAN, X. L. Metabolic Versatility of Mycobacterium tuberculosis during Infection and Dormancy. **Metabolites**, v. 11, n. 2, p. 88, 2021.

CHATKIN, J. M.; CHAIEB, J. A. Utilidade dos testes de sensibilidade do bacilo da tuberculose em saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, v. 16, n. 2, p. 120–126, 1982.

CHEGOU, N. N. et al. Tuberculosis assays: Past, present and future. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 9, n. 4, p. 457–469, 2011.

CHENGALROYEN, M. D. et al. Detection and quantification of differentially culturable tubercle bacteria in sputum from patients with tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 194, n. 12, p. 1532–1540, 2016.

CHO S.; LEE H. S.; FRANZBLAU, S. Microplate Alamar Blue Assay (MABA) and Low Oxygen Recovery Assay (LORA) for Mycobacterium tuberculosis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1285, p. 281–292, 2015.

CLSI. **M07-A10**: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; 10. ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

CLSI. **M24**: Susceptibility Testing of Mycobacteria, *Nocardia* spp., and Other Aerobic Actinomycetes. 3. ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

CLSI. **Supplement M62: Performance Standards for Susceptibility Testing of Mycobacteria, *Nocardia* spp., and Other Aerobic Actinomycetes.** 1. ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

COBAN, A. Y. et al. Drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by the broth microdilution method with 7H9 broth. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 111–113, 2004.

CUNNINGHAM, A. F.; SPREADBURY, C. L. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: Cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton α -crystallin homolog. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 4, p. 801–808, 1998.

CURVO-SEMEDO, L.; TEIXEIRA, L.; CASEIRO-ALVES, F. Tuberculosis of the chest. **European Journal of Radiology**, v. 55, n. 2, p. 158–172, 2005.

DAVIES, B. I. The importance of the geometric mean MIC. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 25, n. 3, p. 471–472, 1990.

DEB, C. et al. 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, p. 1–15 2009.

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. The biology of mycobacterium tuberculosis infection. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, 2013.

DHEDA, K.; BARRY, C. E.; MAARTENS, G. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 387, n. 10024, p. 1211–1226, 2015.

DÍAZ-INFANTES, M. S. et al. Evaluation of the MB/BacT mycobacterium detection system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1988–1989, 2000.

DORMAN, S. E. et al. 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, 2018.

DUSTHACKER, A. et al. Differential culturability of *Mycobacterium tuberculosis* in culture-negative sputum of patients with pulmonary tuberculosis and in a simulated model of dormancy. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–9, 2019.

EL KHÉCHINE, A.; DRANCOURT, M. Diagnosis of pulmonary tuberculosis in a microbiological laboratory. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 41, n. 10, p. 509–517, 2011.

ESPASA, M. et al. Evaluation of the VersaTREK system compared to the bactec MGIT 960 system for first-line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 488–491, 2012.

EVANGELOPOULOS, D. et al. Comparative fitness analysis of D-cycloserine resistant mutants reveals both fitness-neutral and high-fitness cost genotypes. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2019.

FERREIRA, A. W.; MORAES, S. L. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 477 p.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3–66, 2013.

GAN, Y.; YAO, Y.; GUO, S. The dormant cells of *Mycobacterium tuberculosis* may be resuscitated by targeting-expression system of recombinant mycobacteriophage-Rpf: Implication of shorter course of TB chemotherapy in the future. **Medical Hypotheses**, v. 84, n. 5, p. 477–480, 2015.

GAO, B.; GUPTA, R. S. Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 1, p. 66–112, 2012.

GOLD, B.; NATHAN, C. Targeting Phenotypically Tolerant Mycobacterium tuberculosis. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 1, 2017.

GUPTA, R. K.; SRIVASTAVA, B. S.; SRIVASTAVA, R. Comparative expression analysis of rpf-like genes of Mycobacterium tuberculosis H₃₇R_v under different physiological stress and growth conditions. **Microbiology**, v. 156, n. 9, p. 2714–2722, 2010.

HALL, L. et al. Antimicrobial susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis complex for first and second line drugs by broth dilution in a microtiter plate format. **Journal of Visualized Experiments**, n. 52, p. 1–4, 2011.

HEINRICHS M.T. et al. Mycobacterium tuberculosis Strains H₃₇R_a and H₃₇R_v have equivalent minimum inhibitory concentrations to most antituberculosis drugs. **Int J Mycobacteriol**, v. 7, p. 145–161, 2018.

HUANG, T. S. et al. Use of MGIT 960 for rapid quantitative measurement of the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis complex to ciprofloxacin and ethionamide. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 600–603, 2004.

JAIN, P. et al. Reporter phage and breath tests: Emerging phenotypic assays for diagnosing active tuberculosis, antibiotic resistance, and treatment efficacy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. SUPPL. 4, p. 1142–1150, 2011.

KANA, B. D.; MIZRAHI, V. Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling. **Immunol Med Microbiol**, v. 58, p. 39–50, 2010.

KANIGA, K. et al. A multilaboratory, multicountry study to determine MIC quality control ranges for phenotypic drug susceptibility testing of selected First-Line Antituberculosis Drugs, Second-Line Injectables, Fluoroquinolones, Clofazimine, and Linezolid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 2963–2968, 2016.

KAPRELYANTS, A. S.; GOTTSCHAL, J. C.; KELL, D. B. Dormancy in non-sporulating bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 104, n. 3–4, p. 271–286, 1993.

KAUFMANN, S. H. E. How can immunology contributed to TB control. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, p. 20–30, 2001.

KENT, P. T.; KUBICA, G. P. **Public Health Mycobateriology**: A guide for level III laboratory. Atlanta: CDC, 1985. 203 p.

KIM, H. et al. Evaluation of MGIT 960 System for the Second-Line Drugs Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis Research and Treatment**, v. 2013, p. 1–6, 2013.

LEITE, C. Q. F. et al. Standartization of Broth Microdilution Method for Mycobacterium tuberculosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 127–129, 2000.

LEUNG, A. N. Pulmonary tuberculosis: The essentials. **Radiology**, v. 210, n. 2, p. 307–322, 1999.

LEVIN-REISMAN, I. et al. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. **Science**, v. 355, n. 6327, p. 826–830, 2017.

LIMA, T. M. de et al. Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 2, p. 65–76, 2017.

LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE. **Genus Mycobacterium**. Disponível em: <<https://lpsn.dsmz.de/genus/mycobacterium>>. Acesso em: 16 fevereiro 2021.

MANIKANDAN, S. Measures of central tendency: The mean. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p. 140, 2011.

MANINA, G.; DHAR, N.; MCKINNEY, J. D. Stress and host immunity amplify mycobacterium tuberculosis phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. **Cell Host and Microbe**, v. 17, n. 1, p. 32–46, 2015.

MAYANJA-KIZZA, H. et al. Immunoadjuvant prednisolone therapy for HIV-associated tuberculosis: A phase 2 clinical trial in Uganda. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 6, p. 856–865, 2005.

MCNERNEY, R. et al. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: Needs, challenges, recent advances, and opportunities. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 2, p. 147–158, 2012.

MENZIES, D. et al. Effect of duration and intermittency of rifampin on tuberculosis treatment outcomes: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 9, 2009.

MILLER, M. B. et al. Performance of Xpert MTB/RIF RUO assay and IS6110 real-time PCR for mycobacterium tuberculosis detection in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3458–3462, 2011.

MILSTEIN, M. et al. Evaluation of high-dose rifampin in patients with new, smear-positive tuberculosis (HIRIF): Study protocol for a randomized controlled trial. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2016.

MIRANDA, S. S. de et al. Evaluation of the Commercial Kit SIRE Nitratase for Detecting resistant mycobacterium tuberculosis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 4, p. 550–553, 2017.

MUKAMOLOVA, G. V. et al. A bacterial cytokine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 15, p. 8916–8921, 1998.

MUKAMOLOVA, G. V. et al. 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.

NAMUKWAYA, E. et al. Predictors of treatment failure among pulmonary tuberculosis patients in Mulago hospital, Uganda. **Afr Health Sci**, v. 11, n. 1, p. 105-111, 2011.

NAIDOO, K., DOOKIE N. Insights into Recurrent Tuberculosis: Relapse Versus Reinfection and Related Risk Factors. **Tuberculosis**, p. 1-36, 2018.

PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Diseases Primer**, v. 2, p. 1–23, 2016.

PALOMINO, J. C. Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 12, n. 3, p. 172–178, 2006.

PERES, R. L. et al. Reduction of contamination of mycobacterial growth indicator tubes using increased PANTA concentration. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 15, n. 2, p. 281-283, 2011.

PERES, R. L. et al. Evaluation of Oral Antiseptic Rinsing before Sputum Collection To Reduce Contamination of Mycobacterial Cultures. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 8, p. 3058–3060, 2011.

PHOLWAT, S. et al. Rapid first- and second-line drug susceptibility assay for mycobacterium tuberculosis isolates by use of quantitative PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 69–75, 2011.

PUSPITA, I. D. et al. Resuscitation Promoting Factor (Rpf) from *Tomitella biformata* AHU 1821T Promotes Growth and Resuscitates Non-Dividing Cells. **Microbes Environ.**, v. 28, n. 1, p. 58–64, 2013.

RODRIGUES C. et al. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against second-line drugs using the Bactec MGIT 960 System. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 12, n. 12, p. 1449–1455, 2008.

RODRIGUES, C.; VADWAI, V. Tuberculosis: Laboratory Diagnosis. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 32, n. 2, p. 111–127, 2012.

ROSEN, B. C. et al. Long-Chain Fatty Acyl Coenzyme A Ligase FadD2 Mediates Intrinsic Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 2, p. 1–13, 2017.

ROSSER, A. et al. Resuscitation-promoting factors are important determinants of the pathophysiology in Mycobacterium tuberculosis infection. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 621–630, 2017.

SIDDIQI, H. S.; RÜSCH-GERDES, S. **MGIT Procedure Manual**. Foundation for Innovative New Diagnostics, 2006.

SCANGA, C. A. et al. Reactivation of latent tuberculosis: Variations on the cornell murine model. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4531–4538, 1999.

SCARPARO, C. et al. Evaluation of the Fully Automated BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to Pyrazinamide, Streptomycin, Isoniazid, Rifampin, and Ethambutol and Comparison with the Radiometric BACTEC 460TB Method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1109–1114, 2004.

SOTGIU, G. et al. Epidemiology and clinical management of XDR-TB: A systematic review by TBNET. **European Respiratory Journal**, v. 33, n. 4, p. 871–881, 2009.

TELKOV, M. V. et al. Proteins of the Rpf (resuscitation promoting factor) family are peptidoglycan hydrolases. **Biochemistry (Mosc)**, v. 71, n. 4, p. 414-422, 2006.

TEO, D. T. W.; LIM, T. W. Transmission of Tuberculosis from Patient to Healthcare Workers in the Anaesthesia Context. **Annals of the Academy of Medicine Singapore**, v. 33, n. 1, p. 95–99, 2004.

TROLLIP, A. P. et al. Second-line drug susceptibility breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis* using MODS assay. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 18, n. 2, p. 227–232, 2014.

TURAPOV, O. et al. Antimicrobial treatment improves mycobacterial survival in nonpermissive growth conditions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2798–2806, 2014.

TURAPOV, O. et al. Phenotypically Adapted *Mycobacterium tuberculosis* Populations from Sputum Are Tolerant to First-Line Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2476–2483, 2016.

VILCHÈZE, C.; KREMER, L. Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative *Mycobacterium tuberculosis*: The Koch Paradox. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 2, p. 1–14, 2017.

WALLIS, R. S. et al. 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, 2016.

WAYNE, L. G. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 13, n. 11, p. 908–914, 1994.

_____. In Vitro Model of Hypoxically Induced Nonreplicating Persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods Mol Med**, v. 54, p. 247–269, 2001.

WAYNE, L. G.; SOHASKEY, C. D. Nonreplicating Persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 139–163, 2001.

XU, Y., WANG, G., XU, M. Biohazard levels and biosafety protection for *Mycobacterium tuberculosis* strains with different virulence. **Biosafety and Health**, v. 2, n. 3, p. 135–141, 2020.

YU, X. et al. Validation of cycloserine efficacy in treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in Beijing, China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 1–8, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Treatment of Tuberculosis Guideline**. 4. ed. Geneva, 2010.

_____. **Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis**. Geneva, 2018.

_____. **Consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment**. Geneva, 2019.

_____. **Global Tuberculosis Report 2020**. Geneva, 2020.

_____. **Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis**. Geneva, 2021.

Anexos

ANEXO A – Preparo das soluções estoque dos antimicrobianos

Para calcularmos o volume de diluente necessário para preparar as soluções estoque dos antimicrobianos, utilizamos a seguinte fórmula:

$$\text{Volume (ml)} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Potência } (\mu\text{g/mg})}{\text{Concentração } (\mu\text{g/ml})}$$

Antimicrobiano	Potência ($\mu\text{g/mg}$)	Concentração da ST ($\mu\text{g/ml}$)	Diluente	Referência*
Estreptomicina	762	1280	Água	D7253
Isoniazida	990	1280	Água	I3377
Rifampicina	980	1280	Metanol	R3501
Etambutol	740	6400	Água	E4630
Pirazinamida	1000	25600	DMSO	P7136
Levofloxacina	996	1280	DMSO	28266
Linezolida	995	1280	DMSO	PZ0014
Bedaquilina	970	256	DMSO	SC-503269
Clofazimina	1000	1280	DMSO	C8895
Cicloserina	1000	10240	Água	30020
Amicacina	1000	1280	Água	A1774

ST= Solução estoque

* Todos os antimicrobianos utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich®, com exceção da Bedaquilina que foi adquirida da Santa Cruz Biotechnology®.

Apêndice

APÊNDICE A

Amostra	Baciloscopia	Cultura	Xpert® MTB/RIF	UFC/ml (Log ₁₀)	NMP (Log ₁₀)	NMP_SN (Log ₁₀)	TR (Log ₁₀)	TI (Log ₁₀)	%BR
M001	3+	Contaminada	High 1 ^a A	5,26	5,26	5,26	0,00	0,00	0,00
M002	3+	3+	High 1 ^a A	4,48	5,84	5,43	0,95	1,36	88,89
M003	3+	2+	High 1 ^a A	4,02	5,27	4,95	0,93	1,26	88,24
M005	3+	3+	High	4,54	2,93	5,66	1,12	-1,61	92,39
M006	3+	3+	High 1 ^a A	6,73	6,74	7,01	0,28	0,01	47,67
M008	3+	3+	High	5,82	2,42	6,42	0,60	-3,40	74,72
M013	2+	2+	High	3,85	4,40	4,40	0,56	0,56	72,22
M014	3+	3+	High	6,11	5,92	5,92	-0,19	-0,19	0,00
M016	3+	3+	High	5,91	5,66	5,66	-0,26	-0,26	0,00
M017	1+	2+	Medium	4,61	4,68	4,95	0,34	0,07	54,12
M019	3+	3+	High 1 ^a A	5,71	1,93	6,66	0,95	-3,78	88,78
M021	1+	1+	High 1 ^a A	3,41	1,26	4,26	0,84	-2,16	85,56
M023	2+	3+	High 1 ^a A	4,54	4,95	4,95	0,41	0,41	60,78
M025	3+	2+	High	7,20	6,98	7,23	0,02	-0,23	4,67
M030	1+	1+	High 1 ^a A	5,56	5,70	6,29	0,73	0,14	81,50

Amostra	Baciloscopia	Cultura	Xpert® MTB/RIF	UFC/ml (Log ₁₀)	NMP (Log ₁₀)	NMP_SN (Log ₁₀)	TR (Log ₁₀)	TI (Log ₁₀)	%BR
M034	3+	3+	High 1 ^a A	6,91	7,06	6,79	-0,12	0,15	0,00
M035	3+	Negativa	High	4,35	4,81	4,81	0,46	0,46	65,22
M038	3+	3+	High 1 ^a A	7,72	7,96	7,96	0,24	0,24	42,39
M041	3+	3+	High	4,45	4,66	5,66	1,22	0,22	93,91
M046	3+	3+	High	6,89	7,33	7,33	0,43	0,43	63,16
M050	2+	11 colônias	Low 1 ^a A	2,75	2,66	3,26	0,50	-0,09	68,56
M051	3+	3+	High 1 ^a A	4,62	1,28	5,28	0,66	-3,34	78,17
M052	2+	3+	High	5,97	5,66	6,93	0,96	-0,31	89,02
M058	3+	3+	High	6,20	4,46	6,66	0,46	-1,74	65,22
M060	1+	1+	Medium	4,16	0,00	5,18	1,02	0,00	90,47
M062	3+	3+	High 1 ^a A	6,24	1,94	7,69	1,45	-4,30	96,46
M065	3+	3+	High	6,34	5,76	6,76	0,42	-0,58	61,74
M066	3+	3+	High	6,23	0,00	6,68	0,45	0,00	64,57
M067	2+	3+	High	3,89	0,00	4,67	0,78	0,00	83,35
M068	3+	1+	High	5,18	4,93	5,93	0,74	-0,26	82,00
M069	3+	1+	High	5,18	0,00	5,95	0,77	0,00	83,18
M070	1+	1 Colônia	Low	1,63	1,78	1,78	0,14	0,14	28,33
M071	2+	3+	Medium 1 ^a A	5,29	5,68	5,68	0,39	0,39	59,57

Amostra	Baciloscopia	Cultura	Xpert® MTB/RIF	UFC/ml (Log ₁₀)	NMP (Log ₁₀)	NMP_SN (Log ₁₀)	TR (Log ₁₀)	TI (Log ₁₀)	%BR
M072	1+	2+	High 1 ^a A	4,93	4,93	5,93	0,99	-0,01	89,88
M073	3+	3+	High	4,92	2,93	4,93	0,01	-1,99	2,00
M075	3+	3+	High	5,61	5,40	5,83	0,21	-0,21	38,96
M076	3+	3+	High	6,01	3,93	7,68	1,67	-2,08	97,85
M077	Negativa	Negativa	High 1 ^a A	0,00	0,00	1,76	0,00	0,00	100,00
M078	2+	Negativa	High	5,28	5,28	5,68	0,41	0,00	60,87
M081	3+	Negativa	High 1 ^a A	6,42	6,46	6,66	0,24	0,04	42,17
M082	Negativa	2+	Medium	4,38	4,93	4,46	0,08	0,55	17,24
M084	Negativa	2+	Low 1 ^a A	4,32	3,70	4,70	0,38	-0,62	58,04
M085	3+	3+	High	6,53	5,79	7,06	0,53	-0,74	70,59
M086	3+	3+	High 1 ^a A	5,46	5,06	5,79	0,33	-0,41	53,04
M087	2+	Negativa	High 1 ^a A	5,94	6,31	6,52	0,58	0,37	73,59
M088	3+	3+	High	5,91	6,20	6,67	0,77	0,29	82,98
M089	3+	3+	High	5,86	5,92	5,92	0,06	0,06	13,76
M091	2+	3+	Medium 1 ^a A	4,96	4,70	4,97	0,01	-0,26	2,35
M092	3+	2+	High 1 ^a A	6,72	6,93	6,93	0,21	0,21	38,47