

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Maria de Fátima Filardi Oliveira Mansur

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PELO MÉTODO  
*RESAZURIN MICROTITER ASSAY-REMA* FRENTE AOS FÁRMACOS  
ANTITUBERCULOSE DE PRIMEIRA E SEGUNDA LINHA E TESTES  
FENOTÍPICOS E FENOTÍPICOS**

Belo Horizonte  
2021

Maria de Fátima Filardi Oliveira Mansur

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PELO MÉTODO  
*RESAZURIN MICROTITER ASSAY-REMA* FRENTE AOS  
FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE DE PRIMEIRA E SEGUNDA LINHA E TESTES  
FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito final para obtenção do título de Doutora em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto (área de Concentração: Ciências Clínicas).

Orientadora: Prof<sup>fa</sup> Silvana Spíndola de Miranda

Belo Horizonte  
2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

M289a Mansur, Maria De Fatima Filardi Oliveira.  
Avaliação da Concentração Inibitória Mínima pelo método Resazurin Microtiter Assay-REMA frente aos Fármacos Antituberculose de primeira e segunda linha e testes fenotípicos e genotípicos [manuscrito]. / Maria De Fatima Filardi Oliveira Mansur. - - Belo Horizonte: 2021.  
149f.: il.  
Orientador (a): Silvana Spíndola de Miranda.  
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Mycobacterium tuberculosis. 2. Estreptomina. 3. Isoniazida. 4. Rifampina. 5. Etambutol. 6. Tuberculose. 7. Dissertação Acadêmica. I. Miranda, Silvana Spíndola de. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QW 125.5.M9

# Declaração da defesa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**AValiação DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PELO MÉTODO Resazurin Microtiter Assay-REMA FRENTE AOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE DE PRIMEIRA E SEGUNDA LINHA E TESTES GENOTÍPICOS**

**MARIA DE FÁTIMA FILARDI OLIVEIRA MANSUR**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia vinte e oito de maio de dois mil e vinte e um, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

Silvana Spindola de Miranda - Orientadora  
UFMG

Enio Roberto Pietra Pedroso  
UFMG

Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis  
UFMG

Cristiane Aparecida Menezes de Pádua  
UFMG

Isabela Neves de Almeida  
UFOP

Afranio Lineu Kritski  
UFRJ

Belo Horizonte, 28 de maio de 2021.



Documento assinado eletronicamente por Afranio Lineu Kritski, Usuário Externo, em 31/05/2021, às 13:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Silvana Spindola de Miranda, Professora do Magistério Superior, em 31/05/2021, às 17:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Cristiane Aparecida Menezes de Padua, Professora do Magistério Superior, em 02/06/2021, às 11:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Enio Roberto Pietra Pedroso, Membro de comissão, em 02/06/2021, às 16:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Professora do Magistério Superior, em 02/06/2021, às 17:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Isabela Neves de Almeida, Usuário Externo, em 07/06/2021, às 14:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0722526 e o código CRC ED990F03.

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

### **Reitora**

Professora Sandra Regina Goulart Almeida

### **Vice-Reitor**

Professor Alessandro Fernandes Moreira

### **Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Professor Fábio Alves da Silva Júnior

### **Pró-Reitor de Pesquisa**

Professor Mário Fernando Montenegro Campos

## **FACULDADE DE MEDICINA**

### **Diretor da Faculdade de Medicina**

Professor Humberto José Alves

### **Vice-Diretora da Faculdade de Medicina**

Professora Alamanda Kfoury Pereira

### **Coordenador do Centro de Pós-Graduação**

Professor Tarcizo Afonso Nunes

### **Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação**

Professora Eli Iola Gurgel Andrade

### **Chefe do Departamento de Clínica Médica**

Professora Eliane Viana Mancuzo

**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto**

Professora Teresa Cristina de Abreu Ferrari

**Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto**

Professora Gilda Aparecida Ferreira

**Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto:**

Professora Claudia Alves Couto

Professora Gilda Aparecida Ferreira

Professora Luciana Costa Faria

Professora Luciana Diniz Silva

Professora Maria de Lourdes de Abreu Ferrari

Professora Suely Meireles Rezende

Professora Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Fábica Carolina Pereira Resende – Representante Discente

À minha família, especialmente à minha mãe.

À minha tia Dra Leny de Souza Filardi.

Ao Eduardo, Vitória e Beatriz, minha razão de viver, meus eternos amores.

**AGRADECIMENTOS**

Ao programa de Pós Graduação da Faculdade de Medicina-UFMG.

Ao grupo de pesquisa em micobactérias. Especialmente à professora Silvana Spíndola de Miranda, pelo empenho e dedicação à pesquisa e ensino.

À equipe do laboratório de Microbiologia do HC e do laboratório de Micobacteriologia-HC.

À Valéria Martins, doutora em Microbiologia, pela atenção e apoio para que esse trabalho fosse realizado.

À Lida Jouca, pelo apoio.

Aos meus irmãos e irmãs e toda família.

Às amigas de sempre Flávia Yankous, Maria do Carmo Paolinelli e Simone pela amizade e a todos e muitos que contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

À Luciana, Lílian Croce, Valéria, Shinfay pela companhia, pela atenção e carinho, amigos da Microbiologia.

**RESUMO I**



O diagnóstico rápido de *Mycobacterium tuberculosis* resistente aos fármacos é um desafio em países de baixa renda. Os métodos indicadores de oxi-redução colorimétricos como *Resazurin Microtitre Assay* (REMA) são relativamente novos e indicados pela Organização Mundial da Saúde como testes para determinar a sensibilidade aos fármacos antituberculose.

O objetivo do estudo foi comparar o resultado da Concentração Inibitória Mínima (MIC) do *Mycobacterium tuberculosis* por REMA com MGIT-960 *kit* SIRE (BD BACTEC™ MGIT™ 960 System), GenoType®MTBDR*plus* e GeneXpert®MTB/RIF.

Foram incluídos 27 isolados clínicos de *M. tuberculosis* (14 sensíveis e 13 resistentes) pelo método MGIT-960 *kit* SIRE. O MIC foi realizado pelo método REMA (MIC-REMA), e os testes genotípicos por GenoType®MTBDR*plus* e GeneXpert®MTB/RIF. Para a análise de comparação entre os métodos foi utilizado o teste exato de Fisher's. A concordância entre os resultados do MIC-REMA com o MGIT-960 *kit* SIRE e o GenoType®MTBDR*plus* para rifampicina (RIF) e para isoniazida (INH) com  $kappa < 0,001$ . A mesma concordância foi encontrada entre MIC-REMA de RIF com GeneXpert®MTB/RIF com  $kappa < 0,001$ .

Esses resultados mostram que o MIC-REMA foram altamente concordantes com os testes fenotípicos e genotípicos para RIF e INH.

Palavras-chave: *M. tuberculosis*; *resazurin assay*; tuberculose multidroga resistente; MIC: concentração inibitória mínima.

## **SUMMARY I**

Rapid diagnosis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* is a challenge in low-income countries. Oxi-Reduction Indicator Methods colorimetrics such as Resazurin Microtitre Assay (REMA) are relatively new and indicated by the World Health Organization as tests to determine the sensitivity to antituberculosis drugs.

The aim of the study was to compare the result of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *Mycobacterium tuberculosis* by REMA with MGIT-960 kit SIRE (BD BACTECTM MGITTM 960 System), GenoType®MTBDRplus and GeneXpert®MTB/RIF.

Twenty-seven clinical *M. tuberculosis* isolates (14 sensitive and 13 resistant) were included by the MGIT-960 kit SIRE method. The MIC was performed using the REMA method (MICREMA), and the genotypic tests using GenoType®MTBDRplus and GeneXpert®MTB/RIF.

For the analysis of comparison between the methods, Fisher's exact test was used.

The agreement between the MIC-REMA results with the MGIT-960 kit SIRE and the GenoType®MTBDRplus for rifampicin (RIF) and for isoniazid (INH) with kappa <0.001. The same agreement was found between MIC-REMA of RIF with GeneXpert®MTB/RIF with kappa <0.001.

These results show that the MIC-REMA were highly concordant with the phenotypic and genotypic tests for RIF and INH.

**Keywords:** *M. tuberculosis*; resazurin assay; drug resistant tuberculosis; MIC: minimum inhibitory concentration.

## RESUMO II

Em muitos países os testes diagnósticos para a tuberculose (TB) ainda é realizada por métodos convencionais como a baciloscopia e cultura em meio Löwenstein-Jensen (LJ) e o teste de sensibilidade (TS) pelo método da proporção indireto (MP) que requer 6 a 8 semanas para produzir resultados. Estima-se que um número expressivo de casos de TB-DR não são diagnosticados prontamente e ficam sem tratamento eficaz.

Para o controle global da TB-DR, os laboratórios de micobacteriologia devem fortalecer a capacidade de realizar o TS de primeira e segunda linha por meio de métodos rápidos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou o uso de métodos para tornar mais efetivo o controle da TB e principalmente da TB-DR que tem um aumento significativo de casos anualmente. Dentre eles, encontra-se o *Nitrate Reductase Assay* (NRA), que tem mostrado excelentes resultados, rapidez, aplicabilidade e baixos custos.

Este estudo teve como objetivo avaliar o TS aos fármacos de primeira linha direto de amostras clínicas respiratórias pelo método NRA (NRA-D) utilizando o *kit* SIRE Nitratase®PNB para estimar o desempenho do método comparando com o MGIT 960 *kit* SIRE, método utilizado como referência.

**Métodos:** As amostras respiratórias com baciloscopia positiva foram coletadas em dois hospitais de Belo Horizonte, Minas Gerais (MG), Brasil, um de referência em TB e outro de alto complexidade. As amostras foram processadas nos respectivos laboratórios e após testadas quanto à sensibilidade a rifampicina (RIF), isoniazida (INH), estreptomicina (S) e etambutol (E) por NRA-D no laboratório de Micobactérias da Faculdade de Medicina e pelo MGIT 960 no laboratório de referência do estado de MG.

**Resultados:** A concordância entre os métodos foi avaliada pelo parâmetro *k*, que teve como resultados: 0,96, 0,92, 0,88 e 0,66 para rifampicina (RIF), isoniazida (INH), estreptomicina (S) e etambutol (E), respectivamente. A sensibilidade e especificidade foram de 99,3% e 100% para RIF, 98,6% e 95,2% para INH, 98,7% e 100% para S e 99,4% e 100% para E, respectivamente, mostrando excelente acurácia quando comparado com o MGIT 960 *kit* SIRE.

Com relação ao tempo de leitura, 33,3% das amostras foram reveladas após 14 dias, 38,8% após 21 dias ( total acumulado de 72% em 21 dias) e 27,8% após 28 dias, que são semelhantes aos dos métodos automatizados.

**Conclusão:** os resultados de acúrcia e concordância e a rapidez da obtenção dos resultados, mostram que esse método pode ser utilizado em substituição aos métodos mais demorados em países onde não há recursos para o uso de técnicas moleculares e automatizadas.

**Palavras chave:** *M. tuberculosis*; SIRE Nitratase; TB multidrogaresistente

## SUMMARY II

In many countries diagnostic testing for tuberculosis (TB) is still performed by conventional methods such as bacilloscopy and culture in Löwenstein-Jensen medium (LJ) and the sensitivity test (TS) by the indirect proportion method (MP) it requires 6 to 8 weeks to produce results. It is estimated that a number expressive number of DR-TB cases are not readily diagnosed and are left without effective treatment.

For global control of DR-TB, mycobacteriology laboratories must strengthen the ability to perform first- and second-line TS through quick methods. The World Health Organization (WHO) recommended the use of methods to make TB control more effective and especially DR-TB that has a significant increase in cases annually. Among them is Nitrate Reductase Assay (NRA), which has shown excellent results, speed, applicability and low costs.

This study aimed to evaluate the TS to first-line drugs directly from respiratory clinical samples by the NRA method (NRA-D) using the SIRE kit Nitratase®PNB to estimate method performance compared to MGIT 960 SIRE kit, method used as reference.

**Methods:** Respiratory samples with positive bacilloscopy were collected in two hospitals in Belo Horizonte, Minas Gerais (MG), Brazil, one of reference in TB and another of high complexity. The samples were processed in the respective laboratories and after being tested for sensitivity to rifampicin (RIF), isoniazid (INH), streptomycin (S) and ethambutol (E) by NRA-D in the Mycobacteria laboratory of the Faculty of Medicine and by MGIT 960 in the reference laboratory of the state of MG.

**Results:** The agreement between the methods was evaluated by the parameter  $k$ , which had as results: 0.96, 0.92, 0.88 and 0.66 for rifampicin (RIF), isoniazid (INH), streptomycin (S) and ethambutol (E), respectively. The sensitivity and specificity were 99.3% and 100% for RIF, 98.6% and 95.2% for INH, 98.7% and 100% for S and 99.4% and 100% for E, respectively, showing excellent accuracy when compared to the MGIT 960 SIRE kit.

Regarding the reading time, 33.3% of the samples were revealed after 14 days, 38.8% after 21 days (accumulated total of 72% in 21 days) and 27.8% after 28 days, which are similar to automated methods.

**Conclusion:** the accuracy and agreement the results and speed of obtaining the results, show that this method can be used to replace the methods more time-consuming in countries where there are no resources for the use of molecular techniques and automated.

**Keywords:** *M. tuberculosis*; SIRE Nitratase; Multidrug-resistant TB.

## LISTAS

### LISTA DE ILUSTRAÇÕES - ESTUDO I

<b>Figura 1:</b> Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil hab.) por Unidade Federada 2020.....	29
<b>Figura 2:</b> Coeficiente de mortalidade de tuberculose (por 100 mil hab.) por Unidade Federada, 2020.....	30
<b>Figura 3:</b> Morfologia do bacilo do <i>M. tuberculosis</i> visto por microscopia eletrônica...35	
<b>Figura 4:</b> Diagrama representativo da estrutura da parede celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	37
<b>Figura 5:</b> Morfologia do bacilo do <i>M. tuberculosis</i> pelo método Ziehl-Neelsen.....	52
<b>Figura 6:</b> Morfologia dos bacilos do <i>M. tuberculosis</i> com a coloração com fluorocromo (auramina-rodamina) .....	53
<b>Figura 7:</b> Microscópio de emissores de luz – LED .....	54
<b>Figura 8:</b> Colônias com aspecto serpentiginoso de <i>M. tuberculosis</i> em meio Löwenstein-Jensen.....	55
<b>Figura 9:</b> Colônias de <i>M. tuberculosis</i> em meio Löwenstein-Jensen.....	55
<b>Figura 10:</b> Equipamento GeneXpert®MTB/RIF.....	59
<b>Figura 11:</b> Equipamento Truenat MTB, MTB Plus and MTB-RIF Dx assays .....	60
<b>Figura 12:</b> Teste de amplificação isotérmica TB-LAMP .....	61
<b>Figura 13:</b> Esquema de procedimentos do ensaio de sonda em linha - LPA .....	74
<b>Figura 14:</b> Fita Genotype revelada.....	74

**Figura 15:** Diagrama representativo preparação da microplaca para diluição de soluções de fármacos.....82

**Figura 16:** MIC – REMA de rifampicina.....86

**Figura 17:** MIC – REMA de isoniazida .....86

### **LISTA DE TABELAS - ESTUDO I**

**Tabela 1:** Desfechos de cura, abandono e óbito em Minas Gerais.....32

**Tabela 2:** Fármacos usados para tratamento da TB de acordo com as classes e mutações genéticas mais comuns que conferem resistência .....71

**Tabela 3:** Consenso atual para as concentrações críticas dos fármacos de primeira e segunda linha pelos métodos de sensibilidade indicados .....84

**Tabela 4:** Concentrações críticas dos fármacos para o método MIC-REMA.....85

### **LISTA DE ILUSTRAÇÕES - ESTUDO II**

Figura 1: *Kit* comercial SIRE Nitratase® PlastLabor .....127

### **LISTA DE TABELAS - ESTUDO II**

**Tabela 1:** Métodos Diagnósticos Recomendados pela OMS .....119

**Tabela 2:** Comparação dos resultados entre SIRE Nitratase® PNB e MGIT 960 ....129

### **LISTA DE QUADRO - ESTUDO II**



**Quadro 1:** Número de amostras de acordo com a baciloscopia *versus* tempo de  
revelação.....130

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

7H9 Middlebrook 7H9 meio líquido

7H10 Middlebrook 7H10 meio sólido

7H11 Middlebrook 7H11 meio sólido

*ahpC* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à isoniazida

*aftA* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* ao etambutol

AIDS Síndrome da Imunodeficiência Humana

AMI Amicacina

ATCC *American Type Culture Collection*

B.A.A.R Bacilo Álcool Ácido Resistente

CAN Canamicina

CAP Capreomicina

CDC *Centers for Disease Control and Prevention*

CLF Clofazimine

CMTB Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

CRI *Colorimetric Redox Indicator* (testes colorimétricos com indicador de crescimento por meio de reação de oxi-redução)

*dfrA* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à isoniazida

DMSO Dimetilsulfóxido de sódio

DNA Ácido desoxirribonucleico

DLM Delanamida

E Etambutol

EUCAST *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

*eis* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à amicacina e canamicina

*embCAB* grupo de genes com um único promotor (operon) associados a mutações que conferem resistência do *M. tuberculosis* ao etambutol

ETH Etionamida

*fabG-inhA* região promotora na super expressão do gene *inhA* associado à resistência de isoniazida

Fluorquinolonas (FQ): levofloxacina, moxifloxacina, ofloxacina

Fundo Global Fundo Global de Combate à AIDS, Tuberculose e Malária

FUNED Fundação Ezequiel Dias

*furA* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à isoniazida

*gidB* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à estreptomicina

GTX gatifloxacina

*gyrA*, *gyrB* genes associados à resistência do *M. tuberculosis* às fluorquinolonas

HIV *Human Immunodeficiency Virus* -Vírus da Imunodeficiência Humana

INH isoniazida

*inhA* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à isoniazida

*kasA* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à isoniazida

*katG* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à isoniazida

LAMP Amplificação isotérmica mediada por ciclos

LF-LAM Ensaio de lipoarabinomanano de fluxo lateral

LVX Levofloxacina

LJ Lowenstein-Jensen

LPA Ensaio de sonda de linha

LPA FL Ensaio de sonda da linha para fármacos de primeira linha

LPA SL Ensaio de sonda de linha para fármacos de segunda linha

LZD Linezolida

MDR Multidroga-resistente

MODS *Microscopic Observation Drug Susceptibility*

MOX Moxifloxacina

MG Minas Gerais

MGIT Tubo Indicador de Crescimento para Micobactérias

MIC *Minimum Inhibitory Concentration* Concentração Inibitória Mínima

MS Ministério da Saúde

*Mycobacterium tuberculosis M. tuberculosis*

NGS Sequenciamento de nova geração

NRA *Nitrate Reductase Assay*

NRA-D NRA realizado diretamente de amostras clínicas

NRA-I NRA realizado de isolados clínicos do *M. tuberculosis*

OADC Ácido Oléico-Albumina-Dextrose Catalase

OMS Organização Mundial da Saúde

*oxyR* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à isoniazida

PCR Reação em cadeia da polimerase

PNB ácido *p*-aminobenzoico

*pncA* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à pirazinamida

*pstB* gene associado à superexpressão de bombas de efluxo na resistência às fluorquinolonas

PTH Protionamida

PVHIV Pessoas vivendo com HIV / AIDS

PZA Pirazinamida

RIF Rifampicina

Rfb Rifabutina

RR Rifampicina resistente

RRDR Região determinante de resistência da rifampicina

REMA *Resazurin Microtiter Assay*

*rpoB* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à rifampicina

*rpsA* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à pirazinamida

*rpsL* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à estreptomicina

*rrl*, *rplC* genes associados à resistência do *M. tuberculosis* à linezolida

*rrs* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à estreptomicina

S Estreptomicina

SIRE *streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol*

TB Tuberculose

TB-DR Tuberculose Droga resistente

TB Hr TB resistente à isoniazida e sensível à rifampicina

TB-MDR Tuberculose Multidroga resistente

TB pré-XDR: TB multirresistente (TB MDR / RR) mais resistência a qualquer fluoroquinolona.

TB-RR Tuberculose resistente à rifampicina

TB-XDR: TB extensivamente resistente

*tlyA* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* à capreomicina

TS Teste de Sensibilidade

*ubiA* gene associado à resistência do *M. tuberculosis* ao etambutol

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

WGS *Whole Genome Sequencing* Sequenciamento do genoma completo.

WHO *World Health Organization*

WRD WHO *recommended Rapid Diagnostic* Diagnósticos Moleculares Rápidos recomendados pela OMS

*whiB7* região promotora associada à resistência cruzada do *M. tuberculosis* à estreptomicina e canamicina

ZN Zielh-Neelsen

## SUMÁRIO

### ESTUDO I – AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PELO MÉTODO *Resazurin Microtiter Assay*-REMA FRENTE AOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE DE PRIMEIRA E SEGUNDA LINHA E TESTES GENOTÍPICOS

#### 1

#### INTRODUÇÃO .....25

1.1 O *Mycobacterium tuberculosis* e a tuberculose .....25

1.2 Epidemiologia da tuberculose no mundo.....27

1.3 Epidemiologia da tuberculose no Brasil .....28

1.4 Epidemiologia da tuberculose em Minas Gerais .....32

1.5 A pandemia da COVID-19 e a tuberculose: impacto e implicações.....33

#### 2 REVISÃO DE LITERATURA.....34

2.1 Características gerais do *Mycobacterium tuberculosis*.....34

2.1.1 Morfologia .....34

2.1.2 Estrutura da parede celular .....35

2.1.3 Patogênese .....37

2.1.4 Filogenia do complexo *Mycobacterium tuberculosis* .....38

2.2 Principais mecanismos de resistência do <i>M. tuberculosis</i> frente aos fármacos anti-tuberculose .....	40
2.3 Resistência bacteriana na tuberculose .....	46
2.4 Diagnóstico Laboratorial .....	50
2.4.1 Microscopia – baciloscopia .....	50
2.4.2 Cultura .....	54
2.4.2.1 Métodos fenotípicos manuais .....	54
2.4.2.2 Métodos automatizados .....	56
2.4.3 Identificação bioquímica .....	57
2.4.3.1 Métodos fenotípicos .....	57
2.4.3.2 Métodos genotípicos .....	57
2.5 Teste de sensibilidade aos fármacos antituberculose (TS).....	61
2.5.1 Métodos fenotípicos.....	61
2.5.1.1 Método da Proporção indireta (MP) .....	61
2.5.1.2 Métodos automatizados – plataforma de macrodiluição BACTECTM Mycobacterial Growth Indicator Tube™ 960 (MGIT Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA).....	64

2.5.1.3 Métodos de Determinação da Concentração Inibitória Mínima - MIC ( <i>Minimal Inhibitory Concentration</i> ) .....	65
2.5.1.4 Métodos Colorimétricos.....	66
2.5.1.4.1 REMA ( <i>Resazurin Microtitre Assay</i> ) e MTT (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2, 5-difenil tetrazólio).....	66
2.5.1.4.2 MODS ( <i>Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay</i> ).....	66
2.5.1.4.3 <i>Nitrate Reductase assay</i> (NRA) .....	67
2.6 Antecedentes científicos do MIC - REMA .....	68
2.7 Considerações sobre resultados de MIC versus detecção de genes de resistência em <i>M. tuberculosis</i> .....	69
2.8 Métodos genotípicos e fenotípicos recomendados pela OMS para detecção de TB e TB-DR.....	71
2.9 Métodos em revisão pela OMS com perspectivas futuras de recomendação para uso no diagnóstico da TB.....	74
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>75</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>77</b>
<b>5 MATERIAIS E METODOLOGIA.....</b>	<b>78</b>
<b>NOTA EXPLICATIVA.....</b>	<b>88</b>
<b>ARTIGO.....</b>	<b>89</b>
<b>ESTUDO II - AVALIAÇÃO DO <i>kit</i> SIRE-NITRATASE DIRETO DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ANTI-TUBERCULOSE DE PRIMEIRA LINHA</b>	
<b>6 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>113</b>
<b>7 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>121</b>



<b>8 OBJETIVOS .....</b>	<b>122</b>
<b>9 MATERIAIS E METODOLOGIA .....</b>	<b>123</b>
<b>10 DISCUSSÃO .....</b>	<b>130</b>
<b>11 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>136</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>137</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>148</b>
<b>ANEXO 1: Comprovante de submissão do “Short Communication” à revista Memórias do Instituto Oswaldo Cuz.....</b>	<b>148</b>
<b>ANEXO 2: Parecer Consubstanciado do CEP/UFMG.....</b>	<b>149</b>

# ESTUDO I - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PELO MÉTODO *Resazurin Microtiter Assay*-REMA FRENTE AOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE DE PRIMEIRA E SEGUNDA LINHA E TESTES GENOTÍPICOS

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O *Mycobacterium tuberculosis* e a tuberculose

A tuberculose (TB) é causada pelo complexo do *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) e considerada uma das doenças infecciosas mais importantes ao longo da história humana, tendo em vista que o bacilo do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) pode infectar quase todos os órgãos do corpo, mas causa principalmente infecções pulmonares. (Azadi et al., 2018; WHO 2020a).

O *M. tuberculosis* é um patógeno bem adaptado, com uma longa história de infecções e doenças em humanos, com relatos de casos há mais de 50.000 anos, e que ainda no século XXI necessita de estudos e inovações tecnológicas para um melhor controle epidemiológico, diagnósticos mais acurados e rápidos, tratamento farmacológico mais efetivo e melhor compreensão da dinâmica das infecções e da própria doença. (Farnia et al., 2018; Cegielski, 2018; Schön et al., 2020).

Diante da necessidade de melhor condução e padronização para diagnóstico, tratamento e controle epidemiológico, em outubro de 2020 após uma consulta convocada pelo Programa Global de TB com várias organizações da sociedade civil e acadêmicas, a OMS apresentou as novas definições de TB-DR. (WHO 2021a).

- ✓ TB pré-XDR: TB causada por isolados de *M. tuberculosis* que atendem à definição de TB multirresistente e resistente à rifampicina (TB MDR/RR) mais resistência a qualquer fluoroquinolona.
- ✓ TB-XDR: TB causada por isolados de *M. tuberculosis* que são TB-MDR/RR mais resistência a qualquer fluoroquinolona (FQ) e também a pelo menos um medicamento adicional do Grupo A, grupo mais potente de medicamentos na classificação de fármacos de segunda linha para o tratamento de formas de TB

resistentes e que usam regimes de tratamento mais longos e incluem levofloxacina (LFX), moxifloxacina (MOX), bedaquilina (BDQ) e linezolida (LNZ).

✓ A definição de TB-MDR permaneceu inalterada: resistência de isolados de *M. tuberculosis* a pelo menos isoniazida (INH) e rifampicina (RIF), fármacos básicos para o tratamento da TB. A TB-RR (definida como TB resistente à RIF pelo teste rápido molecular- TRM) e requer um manejo clínico semelhante ao da TB-MDR.

As duas definições de TB pré-XDR e TB-XDR apontam para uma progressão crescente da gravidade da doença, devido à resistência a fármacos adicionais podendo tornar o tratamento sem opções terapêuticas.

As novas definições de pré-XDR e TB-XDR foram modificadas em janeiro de 2021. As mudanças com as novas definições de TB-XDR requerem aumento de escala de testes moleculares rápidos para detectar resistência às fluoroquinolonas (FQ), bem como capacidade laboratorial para realizar Teste de Sensibilidade (TS) para bedaquilina e linezolida. (WHO 2021a).

Um dos principais problemas no controle da TB e da TB-DR é falta de capacidade laboratorial para o diagnóstico em países onde há maior prevalência (Ruesen C et al., 2018). Diante deste cenário torna-se necessário a ampliação e utilização de testes que detectem o *M. tuberculosis* e os padrões de resistência tanto aos fármacos de primeira como os de segunda linha, em um tempo menor que os habituais e com custos mais acessíveis. Para a identificação do perfil de TB-DR por métodos automatizados e genotípicos há a necessidade de infraestrutura laboratorial complexa com equipes que sejam altamente capacitadas tecnicamente para realização e interpretação dos testes diagnósticos. (WHO 2018; Miotto et al., 2018; Dookie et al., 2018).

Entre 2018 e 2019, houve progressos nos testes de detecção e conseqüentemente no tratamento de TB-MDR/RR, ano em que a taxa de pacientes com TB bacteriologicamente confirmada e testados para resistência à RIF foi de 61%, como resultado da implantação TRM-TB Gene Xpert®MTB/RIF em vários locais do mundo

por meio de um consórcio entre a empresa fabricante e outras organizações para subsidiar os custos. (WHO 2018).

## 1.2 Epidemiologia da tuberculose no mundo

Em 2019, relatórios da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimaram que houve aproximadamente 10 milhões de novos casos, e desses, 477.461 vivem com o Vírus da Imunodeficiência Humana - HIV, coinfeção que aumenta os desafios do controle da TB, já que entre essas pessoas a probabilidade de desenvolver a forma ativa é entre 20 a 30 vezes maior, tornando o cenário de saúde pública mundial por essa doença ainda mais grave e desafiador. Aproximadamente 1,4 milhão de pessoas morreram em 2019, sendo 1,2 milhão entre pessoas que não vivem com o HIV e 208.000 entre pessoas coinfectadas o que representa 22% do total. Esses números corroboram com o MTB como o patógeno humano mais mortal e a TB uma das 10 principais causas de mortes em todo o mundo, embora seja uma doença tratável e curável para a maioria de suas formas. (WHO 2020a).

Ressalta-se que um quarto da população mundial está infectada com o *M. tuberculosis* e, desses, 5 a 10% têm risco de desenvolver a doença, principalmente em populações com fatores de risco atribuíveis, como doenças imunossupressoras, subnutrição, tabagismo, diabetes e consumo de álcool. (WHO, 2020a).

A situação torna-se mais complexa com o aumento da prevalência da TB fármaco resistente (TB-DR). Cerca de 470.000 pessoas adoecem com TB multidroga-resistente (TB-MDR) e resistência à rifampicina (TB-RR) sendo denominada com esse termo quando identificada por meio do teste rápido molecular (TRM-TB) e 80.000 morrem com essa forma de TB a cada ano. (WHO 2020a).

Globalmente, em 105 países a partir de dados representativos, 20% das pessoas com TB-MDR/RR também apresentaram resistência a outro fármaco efetivo para o tratamento da TB-DR, principalmente uma fluoroquinolona. A TB-XDR é uma forma mais séria de TB-MDR. As formas de TB-DR sem a R na sua composição, seja por resistência ou por intolerância, têm resultados de tratamento muito menos efetivos. (WHO 2020a).

Em seu último relatório a OMS estimou que a nível global, 59% de novos casos e 81% de casos com TB previamente tratados tiveram resultados confirmados por testes laboratoriais e um total de 206.030 pessoas com TB-MDR/RR foram detectadas e notificadas em 2019, com aumento de 10% em relação a 2018. Apesar desses avanços, em relação ao tratamento, apenas 38% do número estimado de pessoas que desenvolveram TB-MDR/RR em 2019, receberam tratamento adequado e 57% tiveram sucesso. O Brasil encontra-se entre os 30 países com maior número de casos de TB, e possui altos níveis de cobertura de tratamento (> 80%), juntamente com a China e a Federação Russa, que não corresponde ao desfecho, a cura da doença (WHOa 2020).

Como exposto acima, a resistência aos fármacos ameaça o controle da TB e a efetividade do seu tratamento, que consiste em regime de seis meses com RIF, INH, etambutol (E) e pirazinamida (Z) para TB sensível. Para o tratamento da TB-MDR há a inclusão de fármacos de segunda linha, onde a taxa de sucesso global fica em torno de 48%, e com tempo de duração em torno de 2 anos ou mais, dificultando a adesão ao tratamento com conseqüente fracasso. (Share et al., 2018; WHO 2020b).

Ressalta-se que o uso de fármacos de segunda linha torna o tratamento mais caro, em torno de 10 a 100 vezes, mais tóxico e menos efetivo e com pior prognóstico. (OMS 2020b; Ruesen C et al., 2018).

### 1.3 Epidemiologia da tuberculose no Brasil

O país continua entre os 30 países de alta carga para a TB e para coinfeção TB-HIV, sendo, portanto, considerado prioritário para o controle da doença no mundo pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2021). Em 2020, o Brasil registrou 66.819 casos novos de TB, com um coeficiente de incidência de 31,6 casos por 100 mil habitantes. Em 2019, foram notificados cerca de 4,5 mil óbitos pela doença, com um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos por 100 mil habitantes (BRASIL 2021).

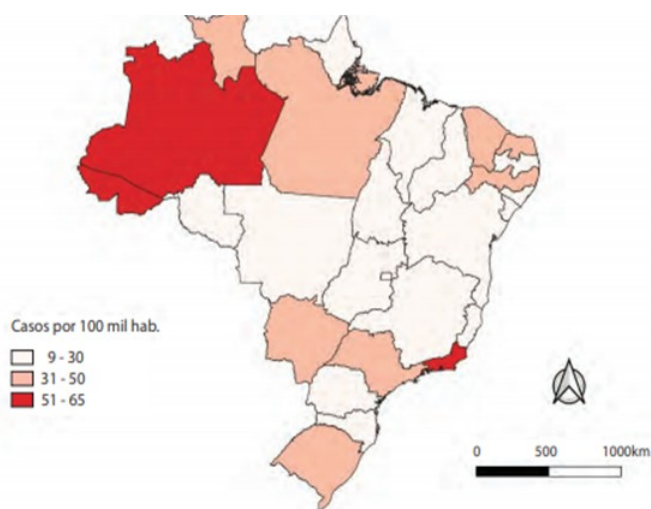
Entre os anos de 2011 e 2016, houve uma tendência de queda no coeficiente de incidência de TB no país, mas entre os anos de 2017 e 2019 observou-se um aumento na taxa de incidência, que na série histórica entre 2011 a 2020 flutuou entre 37,0 a 31,6 por 100 mil habitantes. Todavia, em 2020, em momento de

pandemia pela COVID-19, observou-se uma queda acentuada da incidência em comparação com o ano anterior. (BRASIL 2021).

A TB afeta desproporcionalmente pessoas do sexo masculino, adultos jovens em países de baixa renda com ocorrência de aproximadamente 90% dos casos, demonstrando uma associação direta com a pobreza e fatores socioeconômicos. (WHO 2020a).

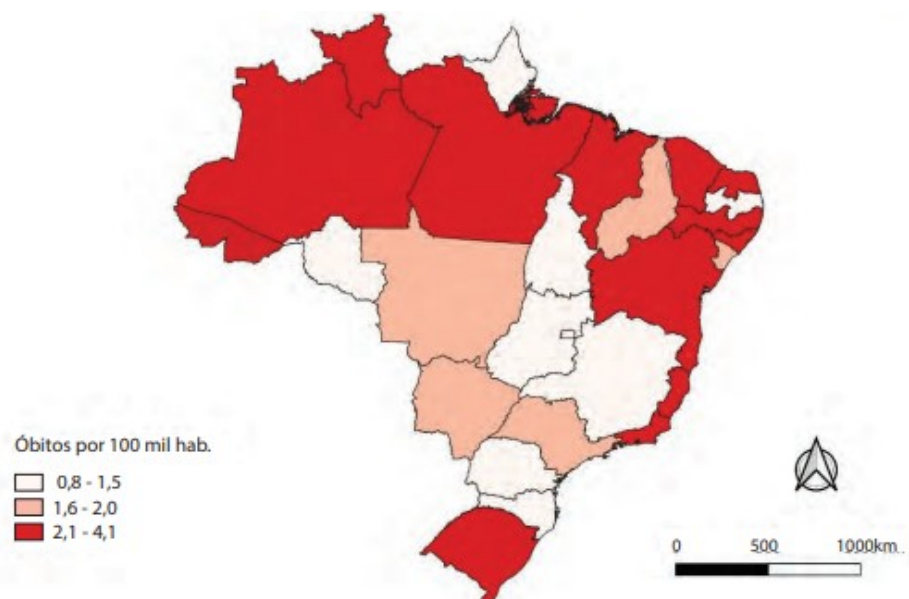
Com relação aos fatores atribuíveis à TB, no Brasil, acrescenta-se outro fator de risco além dos citados acima, que se refere à população privada de liberdade (PPL), que em 2019 foram de 8.154 novos casos notificados, o que representa 11,1%. Dessa forma, os casos na PPL superam os casos de coinfeção TB-HIV, representando a maior proporção de casos novos dentre as populações mais vulneráveis ao adoecimento por TB. (WHO 2020a).

**Figura 1:** Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil hab.) por Unidade Federada, 2020.



Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Secretarias Estaduais de Saúde/Ministério da Saúde; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil 2021.

**Figura 2:** Coeficiente de mortalidade de tuberculose (por 100 mil hab.) por Unidade Federada, 2020.



Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Secretarias Estaduais de Saúde/Ministério da Saúde; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil 2021.

Em 13 Unidades Federadas os coeficientes de mortalidade por TB foram próximo ou superior ao coeficiente do país: Amazonas, Rio de Janeiro, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Pará, Maranhão, Rio Grande do Norte, Roraima, Ceará, Acre, Alagoas, Bahia e Espírito Santo. As capitais desses estados também apresentaram os maiores coeficientes de mortalidade quando comparadas às demais capitais do país (BRASIL 2021).

A confirmação laboratorial da TB teve um importante aumento na proporção de casos novos, com pelo menos um resultado positivo nos exames de baciloscopia de escarro, TRM-TB ou cultura. A Rede de Teste Rápido para TB foi implantada em 2014, ano em que se observou aumento na confirmação laboratorial dos casos. Em relação aos casos novos pulmonares, 71,9% desses foram registrados com confirmação laboratorial em 2020, sendo que 41,3% foram diagnosticados pelo TRM-TB (BRASIL 2021).

Dos casos pulmonares de retratamento de TB ( $n = 12.377$ ), em 2020, apenas 31,7% tiveram acesso ao exame de cultura, embora a realização desse exame seja recomendada para todos os casos de retratamento de TB. Dentre aqueles com

resultado positivo na cultura, 50,2% completaram o fluxograma conforme recomendado e tiveram acesso ao TS aos fármacos anti-TB. Dos casos pulmonares de retratamento, 71,4% foram diagnosticados por critério laboratorial (BRASIL 2021).

### **Desfechos do tratamento da tuberculose em 2019.**

#### **Cura:**

- ✓ A proporção de cura entre os casos novos de TB pulmonar com confirmação laboratorial no Brasil foi de 70,1%.
- ✓ As UF do Amapá, Rondônia, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Espírito Santo os percentuais ficaram abaixo do percentual nacional.
- ✓ Por outro lado, o estado do Acre foi o que apresentou o maior percentual de cura, com 89,2%.
- ✓ O percentual foi de 51,2%, entre os casos pulmonares de retratamento de TB confirmados por critério laboratorial. A OMS recomenda 90%.
- ✓ Para os casos de TB-MDR e TB-RR, a proporção de cura/tratamentos completos em 2018 foi de 51,1%.

#### **Abandono:**

- ✓ Para TB sensível, 12,0% dos casos novos pulmonares confirmados por critério laboratorial abandonaram o tratamento – proporção mais que duas vezes superior ao recomendado pela OMS para esse indicador (5,0%).

Porto Alegre (34,0%), Porto Velho (32,6%), Campo Grande (21,4%) e Aracaju (20,1%) foram as capitais que apresentaram os maiores percentuais de abandono.



### Tuberculose drogarresistente (TB-DR):

- ✓ Entre 2015 e 2020, foram diagnosticados 7.749 casos de TB-DR, com uma concentração dos casos nas capitais (53%), 98% desses casos apresentavam a forma pulmonar.
- ✓ Desses, 69% ocorreram em pessoas do sexo masculino, 66% em pessoas negras e 46% em pessoas com idade entre 30 e 49 anos.
- ✓ Em 2020, foram diagnosticados 913 casos de TB-DR (BRASIL 2021).

#### 1.4 Epidemiologia da tuberculose em Minas Gerais:

- ✓ Total de casos de tuberculose em 2020: 3940.
- ✓ Proporção de casos novos confirmados por critério laboratorial em 2019: 79,7
- ✓ Coeficiente de incidência e de mortalidade por 100 mil habitantes: 17,8 e 1,1, respectivamente.
- ✓ Proporção de co-infecção TB-HIV: 9,1%
- ✓ Proporção de retratamento por confirmação laboratorial: 44,3%
- ✓ Proporção por sexo: 71% em homem e 29% em mulheres.

**Tabela 1:** Defechos de cura, abandono e óbito em Minas Gerais.

	Tuberculose sensível	Tuberculose MDR/RR
Cura	66,2	61,9
Abandono	10,8	28,6
Óbito	3,5	7,1

O abandono do tratamento é um dos principais desafios para o controle da TB em MG que atingiu 9,4% nos casos novos, acima dos parâmetros recomendados pelo Ministério da Saúde (menor que 5%) e o percentual de cura desses casos foi de 69,2%, também menor que o recomendado pela OMS (maior que 90%). (SVE/SES-MG 2020).

### 1.5 A pandemia da COVID-19 e TB: impacto e implicações

A pandemia da COVID-19 ameaça reverter o progresso recente na redução da carga global da TB. O número global de mortes por TB pode aumentar em cerca de 0,2-0,4 milhões apenas em 2020, se os serviços de saúde forem interrompidos na medida em que o número de pessoas com TB detectada e tratada poderá aumentar em 25 a 50% em relação a um período de 3 meses. O impacto econômico da pandemia está previsto para piorar pelo menos dois dos principais determinantes da incidência de TB: Produto Interno Bruto (PIB) *per capita* e subnutrição. A modelagem sugeriu que o número de pessoas desenvolvendo TB pode aumentar em mais de 1 milhão por ano no período 2020–2025. (OMS 2020a).

Os impactos negativos sobre os serviços essenciais de TB incluem a realocação de recursos humanos e financeiros e outros da TB para a resposta à COVID-19. Muitos países têm relatado o uso de testes do Gene<sup>®</sup>XpertMTB/RIF para COVID-19, redistribuição de funcionários em programas nacionais de TB para COVID-19 assim como a realocação de orçamentos. Um número menor, mas ainda considerável de países relatou redução do número das unidades de saúde que oferecem atendimento hospitalar e ambulatorial para pessoas com TB, devido a pandemia do novo coronavírus (SARS-CoV-2). Em muitos países já há relatos dessa interferência na coleta de dados e relatórios referentes à TB. (OMS, 2020a).

No Brasil, nessa situação de pandemia, algumas alterações importantes nos indicadores epidemiológicos e operacionais foram observadas, tais como: redução no total de notificações de TB nos três níveis de atenção, com queda mais pronunciada na atenção terciária, e redução no consumo de cartuchos da rede de teste rápido molecular para tuberculose, em comparação com o ano de 2019. (BRASIL 2021).

Em Minas Gerais, observou-se uma queda de 16% na notificação de casos novos de TB em comparação com 2019. Essa redução foi mais pronunciada a partir do mês de abril, sendo que em maio verificou-se a maior variação do período (-34%) em relação aos casos notificados. Paralelamente, constatou-se uma diminuição de 14% no consumo de cartuchos de teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB)

quando comparado o ano de 2020 ao de 2019. No mês de maio de 2020, particularmente, a redução no consumo de cartuchos foi de 44% em relação ao mês de maio do ano anterior. (BRASIL, 2021).

Diante do cenário atípico, os dados apresentados em 2020 demonstram um comportamento diferente em relação à série histórica da TB, com uma queda acentuada da incidência e uma piora de indicadores tais como aumento do abandono, queda das notificações e redução no consumo de cartuchos de TRM-TB.

Entretanto, não se sabe ainda como a pandemia pode ter influenciado na gravidade da doença, ou se a alteração desses indicadores seria o reflexo de aspectos operacionais, como sobrecarga dos sistemas de saúde, com impacto, sobretudo, na qualidade dos dados. (BRASIL 2021).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Características gerais do *Mycobacterium tuberculosis***

#### **2.1.1 Morfologia**

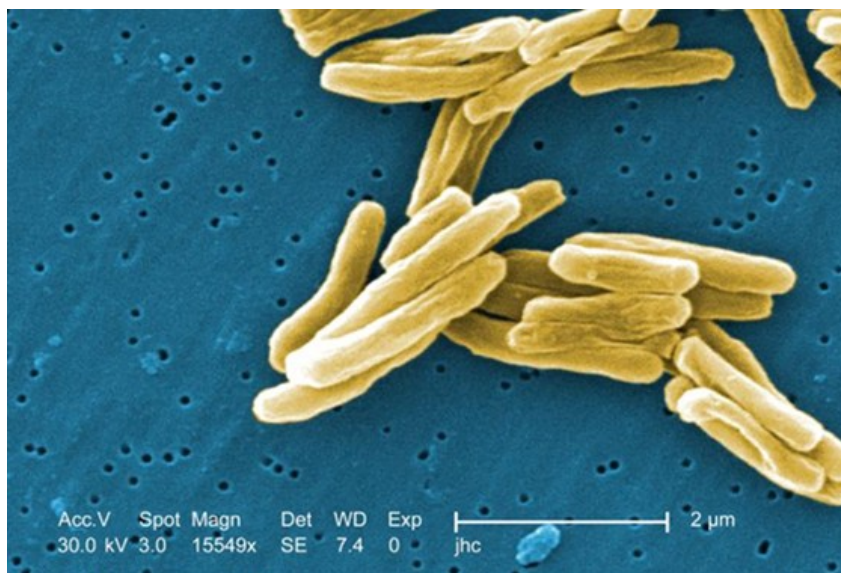
A morfologia clássica é de bastonete delgado quando observados por meio de colorações como o Ziehl-Neelsen (ZN) ou Auramina O, com dimensões de 2,0 a 4,0 micrômetros de comprimento e 0,2 a 0,5 micrômetros de largura (Farnia et al., 2018). Sua morfologia nem sempre aparece em sua forma clássica de bacilo, podem apresentar-se com variações morfológicas que são classificadas em duas categorias: aqueles que frequentemente são vistos na fase exponencial de crescimento que é em forma de V, Y, filamentos ramificados e aqueles em que são vistos ocasionalmente sob estresse ou em condições ambientais desfavoráveis, como em meio sem nutrientes ou sob baixa tensão de oxigênio, que apresentam-se arredondados e agrupados, ovais, semelhantes a esporos ou vacúolos e com a parede celular defectiva sugerindo aspectos granulares. (Gordon & Parish 2017; Farnia et al., 2018).

Essa plasticidade morfológica é um fenômeno desconhecido, pelos quais os microrganismos apresentam quando ganham vantagens adaptativas durante sua multiplicação e divisão em diferentes circunstâncias. No caso do *M. tuberculosis*, a diversidade morfológica é maior que as demais bactérias, e acredita-se que uma

grande variedade de bactérias, podem se transformar em formas em L quando são tratadas com antimicrobianos que impedem a síntese da parede celular assim como quando são os agentes de infecções crônicas (Farnia et al., 2018; Koch & Mizahi 2018).

O *M. tuberculosis* é um bacilo aeróbico obrigatório, e tem seu único reservatório em humanos. Essa característica é responsável pela predileção aos lobos superiores aerados dos pulmões na TB clássica. É um parasita intracelular facultativo, geralmente de macrófagos, e possui um tempo de geração lento, em torno de 20 a 24 horas, tempo muito maior do que outras bactérias que causam infecções humanas, que multiplicam em torno de 20 minutos. (Todar, 2008).

**Figura 3:** bacilo do *M. tuberculosis* visto por microscopia eletrônica



*M. tuberculosis*, micrografia de varredura eletrônica Mag 15549X. CDC.

### 2.1.2 Estrutura da parede celular

A parede celular do *M. tuberculosis* tem características únicas: é espessa e complexa, o que dificulta o diagnóstico e o tratamento da TB, ela atua como uma barreira de permeabilidade, conferindo resistência intrínseca a muitos compostos químicos, incluindo antimicrobianos. Embora classificada como Gram positiva, tem uma estrutura semelhante à das bactérias Gram negativas com uma segunda membrana externa contendo os ácidos micólicos, que são ácidos graxos ramificados e de cadeia longa. A camada externa da membrana citoplasmática forma um

complexo principal, com o núcleo composto por peptidoglicano ligado a arabinogalactano, que por sua vez, estão ligados aos ácidos micólicos (complexo mAGP), esse complexo é o responsável pela resistência do bacilo à solução álcool-ácida durante o processo de coloração (Todar, 2008).

Mais de 60% de sua parede celular é lipídica, com três componentes principais: ácidos micólicos, fator corda e lipídio – D, o que o torna Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR). (Todar, 2008; Gordon & Parish 2018; Koch & Parish, 2018).

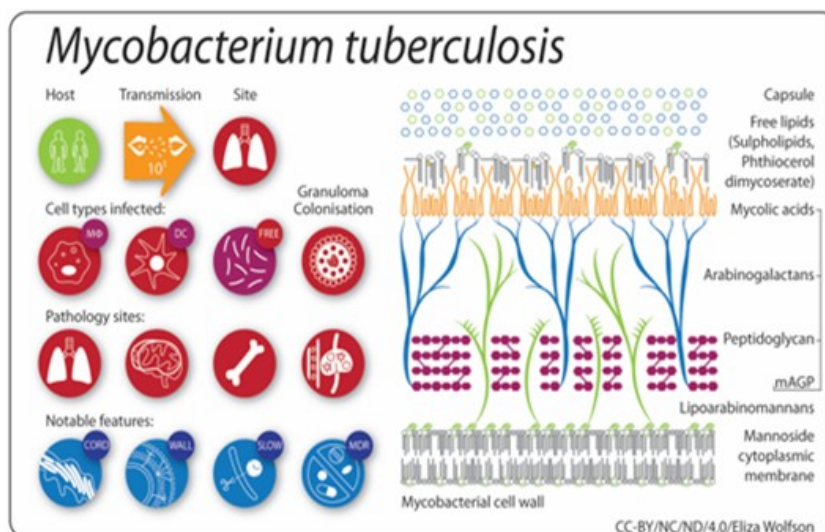
- Os ácidos micólicos são lipídios alfa-ramificados encontrados exclusivamente nas paredes celulares do *Mycobacterium* e *Corynebacterium*. Eles constituem 50% do peso seco do seu envelope. São moléculas hidrofóbicas fortes que formam uma camada lipídica ao redor da célula micobacteriana e afetam as propriedades de permeabilidade na superfície celular. São determinantes de virulência e previnem à micobactéria de proteínas catiônicas, lisozima e radicais de oxigênio no grânulo fagocítico, e protegem as micobactérias extracelulares da deposição de complemento no soro.

- O Fator corda é o responsável pelo aspecto serpentiforme das colônias em meio de cultura *in vitro*, é tóxico para células de mamíferos e um inibidor da migração de polimorfonucleares, além disso, é produzido abundantemente em cepas virulentas e estão localizados no envelope externo da parede celular, também funciona como proteção da bactéria à resposta do hospedeiro.

- Lipídio - D no envelope celular é o principal componente do adjuvante complemento de *Freund* (CFA).

Outra característica definidora do *M. tuberculosis* associada à estrutura da parede celular é a sua taxa lenta de crescimento. Embora as razões metabólicas ao crescimento lento não sejam totalmente compreendidas, a combinação da presença de apenas um único *operon* rRNA, da necessidade de um complexo arsenal na absorção de nutrientes para a síntese da parede celular e de uma taxa lenta de replicação do DNA podem explicar esse fenômeno. (Gordon & Parish 2017).

**Figura 4.** Diagrama representativo da estrutura da parede celular do *M. tuberculosis*



### 2.1.3 Patogênese

A TB é transmitida primariamente por gotículas infectadas, expelidas por um paciente bacilífero e se propagam pelo ar. Após, estes núcleos de gotículas que medem entre 1 a 3 mm contendo de 1 a 3 bacilos são engolfados por macrófagos alveolares, que resulta na morte da maioria dos bacilos, mas alguns sobrevivem extracelularmente e continuam a se multiplicar evitando a fusão fagossomo-lisossomo (Lee 2019).

O bacilo da TB é considerado um patógeno de sucesso pela sua formidável adaptação e capacidade de sobreviver no hospedeiro por longos períodos de tempo sem induzir quaisquer sintomas alternando entre uma fase assintomática de não infecção e uma fase infecciosa clinicamente aparente. A infecção pulmonar tem uma progressão lenta e complexa de natureza inflamatória crônica e caseosa com subsequente formação de cavidades. (Procop, 2016; Wanger et al., 2017; Lee 2019).

A infecção normalmente resulta na formação de granulomas que são macrófagos e outras células do sistema imunológico localizados no parênquima pulmonar onde a infecção se instala, criando uma arquitetura celular. Essas estruturas dinâmicas evoluem de simples agregações celulares com elementos vasculares a lesões

necróticas caracterizadas por hipóxia e falta de nutrientes. Organismos viáveis permanecem nessas lesões ou em linfonodos em um estado metabolicamente inativo ou de replicação lenta, estabelecendo uma infecção latente que pode persistir por anos. Na doença ativa há formação de lesões caseosas e cavitárias (Castro et al., 2020).

Nessas lesões os bacilos são capazes de replicar dentro de macrófagos utilizando diversas moléculas imunomoduladoras e quando há ruptura, um grande número de bacilo pode se disseminar a partir dos pulmões pela transmissão por aerossóis (Lee, 2019). Em pacientes imunossuprimidos uma infecção primária sintomática e ativa pode ser estabelecida assim que ocorre a transmissão pelas gotículas infectadas, como na coinfeção TB-HIV. Embora a tuberculose estabeleça infecção principalmente nos pulmões, quase todos os sítios anatômicos podem ser atingidos como linfonodos, pleura, ossos, articulações e trato geniturinário (Evangelopoulou et al., 2015; Gordon & Parish, 2017).

#### 2.1.4 Filogenia do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Reino: Monera;

Classe: Actinobactérias;

Ordem: Actinomycetales;

Sub-ordem: *Corynebacterium*

Família: *Mycobacteriaceae*;

Gênero: *Mycobacterium*;

Espécie: *M. tuberculosis*.

O CMTB é um grupo de patógenos micobacterianos que causam TB em espécies de mamíferos e constituem um grupo geneticamente homogêneo, são caracterizados por 99,9% de similaridade à nível de nucleotídeos e sequências idênticas de rRNA 16S. O CMTB inclui *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. suricatte*, *M. dassiee* e *M. orygis*. Dessas espécies, o *M. tuberculosis* é o patógeno mais conhecido e mais importante do

ponto de vista epidemiológico e clínico, além da habilidade de infectar animais que têm contato com humanos (Jones et al., 2019).

A análise genômica comparativa revelou baixa diversidade de sequência e evolução clonal em todo o CMTB sugerindo um cenário evolutivo que coloca o *M. tuberculosis* como o mais próximo do ancestral comum do CMTB (Jones et al., 2019).

O estudo por sequenciamento do genoma completo (WGS) de diversos isolados foram divididos em grupos com base no padrão do Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) nos *loci* designados de populações globais de *M. tuberculosis*. Essas inferências filogenéticas mais recentes revelam que as linhagens adaptadas ao homem do CMTB têm uma forte ligação na estrutura filogeográfica, indicando que as sete linhagens principais evoluíram de um ancestral comum e se diversificaram em diferentes regiões do mundo: linhagem 1, também conhecida como Indo-Oceânica, é distribuída ao redor do Oceano Índico e das Filipinas, a linhagem 2 ocorre em países do Leste Asiático; no entanto, dentro desta linhagem está incluída a família Pequim, que é amplamente distribuída em todo o mundo (Jones et al., 2019).

A linhagem 3 está localizada principalmente na África Oriental e na Ásia Central e meridional. A linhagem 4, também chamada de Euro-Americana, está amplamente espalhada pelo mundo. A linhagem 5 (denominado Africa Ocidental 1) e a linhagem 6 (África Ocidental 2) são geograficamente restritos aos países da África Ocidental. E, finalmente, a linhagem 7 que só foi encontrada na Etiópia no sudeste africano ou em pessoas deste país, por isso também é chamada de linhagem etíope (Jones et al., 2019).

As linhagens mostraram características diferentes em termos evolutivos, transmissibilidade, resistência aos fármacos, interação com o hospedeiro, latência e eficácia da vacina. As variações na virulência e patogenicidade mostraram relação em particular com a linhagem 2 (Leste Asiático) e a linhagem 4 (Euro-Americana) que contêm isolados como os genótipos Beijing e Haarlem respectivamente, e que foram associadas com surtos de TB e com casos de isolados resistentes aos fármacos. (Jones et al., 2019).



## 2.2 Principais mecanismos de resistências do *M. tuberculosis* frente aos fármacos anti-tuberculose.

Fármacos de primeira linha: Rifampicina, Isoniazida, Estreptomicina, Etambutol, Pirazinamida.

### ✓ **Rifampicina (RIF).**

Esse fármaco possui alta atividade bactericida para bacilos em fase de replicação ou inativos metabolicamente. A RIF é um fármaco semissintético que se liga à subunidade  $\beta$  da RNA polimerase codificada por *rpoB*, inibindo a transcrição e por consequência a síntese de proteínas. A maioria dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à RIF apresentam mutações na subunidade  $\beta$  do RNA polimerase DNA dependente, codificada pelo gene *rpoB* na região de 81 bp, região determinante da resistência à RIF dos códons 426 a 452. Mutações nos códons 450, 445 e 435 são as mais comuns associadas à resistência a RIF e contribuem com 96% dos fenótipos de resistência (predominantemente de alto nível), com S450L sendo a mutação mais prevalente. Estudos recentes também relataram uma série de mutações fora do DR-RR, como V170F e I491F (Dookie et al., 2018).

Mutações em *rpoB* podem também levar a resistência cruzada com outros derivados da rifamicina, como rifabutina (Rfb), entretanto a estrutura dos fármacos é diferente. Isso leva a diferenças sutis de interação entre o local de ligação e os fármacos e pode explicar mutações diferenciais que causam resistência. Deve-se notar, também, que nem todas as mutações resultam no mesmo nível de resistência. Por exemplo, a substituição de histidina por leucina não polar (H445L) tem um impacto muito reduzido em comparação com o aspartato carregado negativamente (H445D) (MIC ~ 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  vs. > 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). (Phelan et al., 2018).

A ocorrência de monorresistência a RIF varia em diferentes cenários, representando até 10% dos casos em algumas regiões, mas a maioria dos isolados resistentes a R também são resistentes a outros fármacos anti-TB, principalmente à INH. A resistência à RIF é um marcador de TB-MDR, entretanto há situações em que isso não reflete a realidade epidemiológica local. (Ng et al., 2019; Dookie et al., 2019).

### ✓ Isoniazida (INH).

Isoniazida é um dos fármacos mais importantes de primeira linha para o tratamento da TB e infecções de TB latente, possui alta atividade bactericida, é ativo contra bacilos de TB metabolicamente ativos e tem bom perfil de segurança (Palomino & Martin 2014). É uma pró-droga ativada pela catalase / peroxidase que é uma enzima codificada pelo gene *katG*. Uma vez ativada, a INH inibe a síntese de ácido micólico via nicotinoil-NAD dependente de NADH-proteína redutase transportadora, codificada pelo gene *inhA*. (Palomino & Martin, 2014).

A base molecular da sua resistência é mediada por mutações no gene *katG*, gene *inhA* ou dentro da região promotora do gene *inhA*. A maioria dos bacilos resistentes estão associadas com mutações gênicas no códon 315 de *katG*, onde a mutação *katG* Ser315Tr em particular é associada a níveis altos de MICs que variam de 2 a >10 mg/L, que é a mais prevalente, respondendo por 60 a 95%, enquanto a deleção parcial do gene *katG* determina MICs muito elevados (> 25,6 mg/L) (OMS 2021).

As combinações de mutações em *katG* e na região promotora *inhA* conferem resistência de alto nível (MIC > 10 mg/L). No entanto, essas variações não explicam toda a heterogeneidade fenotípica observada para mutações *katG*. Aproximadamente 10% dos isolados resistentes à INH não apresentam nenhuma mutação em *katG* e *inhA*, sugerindo que há outros mecanismos envolvidos na resistência (Pai et al., 2016; Lempens et al., 2018; Heyckendorf et al., 2018).

A mudança de nucleotídeo c-15t na região promotora de *fabG1-inhA* leva a uma super expressão de *inhA* e está presente em média em 19% dos isolados clínicos resistentes à INH à nível global. (Lempens et al., 2018). Este mecanismo está associado à resistência de baixo nível em isolado de INH monorresistente e associada com resistência cruzada a análogos estruturais, a etionamida (ETH) e protionomida (PTH). Um estudo recente relatou que as mutações que ocorrem na região reguladora de *inhA* promovem resistência cruzada à ETH. Mutações no gene *dfrA* também foram recentemente associado à resistência à INH (Palomino & Martin, 2014; Lempens et al., 2018).

Estudos relataram mutações no *kasA*, *oxyR-ahpC* e *furA-katG* em isolados de MTB resistentes a INH. No entanto, seu papel exato na mediação da resistência ainda não foi demonstrada (Hammed et al., 2018). As principais mutações de INH, *katG* e *inhA* representam 64,2% e 19,2%, respectivamente. Essas duas mutações, em combinação com mutações que ocorrem comumente no promotor *inhA* e no *ahpC-oxyR*, são responsáveis por 84% da resistência fenotípica global à INH (Dookie et al., 2018).

Análises recentes de WGS mostraram fortes evidências de que a resistência à INH precede a resistência à RIF, associada com a mutação *katG* S315T. Isso torna essa mutação um marcador ideal do fenótipo pré-MDR. Globalmente, a taxa de casos de monorresistência de INH é estimada em 2% a 15%, que estão associados a piores resultados no tratamento padrão de primeira linha, o que corrobora com a necessidade de detecção da resistência em sua forma mais inicial. (Palomino & Martin, 2015; Spitaleri et al., 2019).

Considerando que o tratamento com INH é frequentemente interrompido quando a concentração encontrada é de 0,2 mg/L (em meio sólido), 0,25 mg /L (em meio líquido), 0,10 mg/L para MGIT-960 *kit* SIRE, portanto categorizada como resistente, há evidências que para resistência de nível baixo a moderado, a INH pode ter eficácia com doses elevadas, segundo recomendações da OMS (WHO 2018; Lempens, 2019).

Evidências indicam que essa possibilidade do aumento de dose, somente é possível quando apenas a mutação da região promotora do gene *inhA* for detectada (a dose máxima deve ser de 15 mg/kg por dia) e na ausência de qualquer resistência associada a mutação pelo gene *katG* que normalmente confere altos níveis de resistência e está relacionado a resultados menos efetivos com o aumento de dose. Na presença de ambas mutações, *inhA* e *katG*, a resistência alcança níveis muito altos e o uso da INH não deve ser incluído no tratamento. (Zang et al., 2015; Fowler et al., 2017; Phelan et al., 2018).

#### ✓ Etambutol (E)

O Etambutol é um fármaco de primeira linha que tem ação bacteriostática. Mutações no operon *embCAB*, em particular *embB*, e ocasionalmente *embC*, são responsáveis

pela resistência ao E, que codificam as enzimas arabinofuranosil transferases envolvidas na síntese de componentes da parede celular que é o alvo do E em MTB. Mutações em *embB*, especialmente nos códons 306, 406 e 497, são frequentemente detectadas e dão origem a baixos níveis de resistência. O *embB* códon 306 é a mutação mais frequente em isolados clínicos resistentes ao E, respondendo por até 68% dos isolados resistentes. (Palomino & Martin 2015; Phelan et al., 2018).

No entanto, cerca de 35% dos isolados resistentes a E (MIC = 10 µg/mL) não têm mutações em *embB*, sugerindo outros mecanismos de resistência ainda desconhecidos. Acredita-se que as mutações em *embCAB* (como o *embB306*), *ubiA* e *aftA* possam se acumular e causar uma gama de níveis de MICs, dependendo do tipo e do número de mutações, mas não são suficientes para causar resistência de alto nível (Phelan et al., 2018).

Cerca de 30% de isolados resistentes ao E não apresentam nenhuma mutação em *embB*, enfatizando a necessidade de identificar outros possíveis mecanismos de resistência a este fármaco. Esses achados podem ser consequência na detecção correta da resistência ao E pelos métodos moleculares e fenotípicos atuais. (Palomino & Martin 2015).

#### ✓ Pirazinamida (PZA).

A pirazinamida é um análogo da nicotinamida que foi introduzida ao tratamento da TB para reduzir a duração do tratamento de TB sensível para 6 meses. (WHO 2020b).

Uma característica vital da PZA é sua capacidade de inibir os bacilos semi-dormentes localizados em ambientes ácidos, como os das lesões de TB. A PZA não constitui apenas uma parte do padrão do regime de primeira linha para tratar a TB, mas também é um componente chave de todos os regimes atuais para o tratamento de TB sensível e TB-MDR (Hammed et al., 2018).

É uma pró-droga que é ativada pela enzima pirazinamidase / nicotinamidase (PZase), codificada pelo gene *pncA*. Uma vez ativado, o ácido pirazinóico interrompe a energia da membrana bacteriana, inibindo o transporte na membrana. Recentemente foi proposto que o ácido pirazinóico está envolvido na inibição da

trans-tradução em *M. tuberculosis*. Mutações no gene *pncA* e sua região promotora permanecem como os mecanismos mais comuns de mediação da resistência à PZA. As mutações identificadas dentro deste gene são diversos, com 600 mutações exclusivas em 400 posições relatadas até o momento, representando 72% - 99% da resistência à PZA (Hammed et al., 2018).

A superexpressão de *rpsA* também foi associada em aumento resistência à PZA. No entanto, não houve demonstração clara de que as mutações em *rpsA* estivessem ligadas à resistência a PZA. Uma pequena proporção de isolados resistentes carece de mutações no gene *pncA*, sugerindo que existe outro mecanismo de resistência (Miotto et al., 2018).

O TS para PZA é tecnicamente desafiador e complexo e não confiável tendo em vista que o meio de cultura necessita de pH ácido. Por isso e com base na confiabilidade das mutações do gene *pncA* descritas na literatura, é proposto que a previsão da sensibilidade à PZA com base nessas mutações deve ser aplicada para atingir melhores resultados do tratamento. Um estudo recente realizado em vários países relatou que a resistência à PZA está fortemente associada com resistência à RIF, sugerindo que as taxas de resistência de ambos são similares. (Dookie et al., 2018; Miotto et al., 2018; Hammed et al., 2018).

### **Fármacos de segunda linha: fluorquinolonas (levofloxacin, ofloxacin, moxifloxacin)**

#### **✓ Fluorquinolonas (FQ)**

Fluoroquinolonas são fármacos bactericidas potentes usados atualmente como tratamento de segunda linha para TB-DR. São eficazes contra bacilos do *M. tuberculosis* metabolicamente ativos e inativos. A ciprofloxacina (CIP) e a ofloxacin (OFX) representam a segunda geração das quinolonas, que são derivados do ácido nalidíxico. FQ de nova geração, como a moxifloxacin (MXF) e gatifloxacin (GTX), também estão padronizadas para uso em regimes de tratamento para TB-DR.

O mecanismo de ação molecular é mediado pela inibição da atividade da topoisomerase, que inibe a transcrição de DNA (DNA girase II) e a replicação bacteriana em *M. tuberculosis*. As DNA girases são tetrâmeros compostos por duas

subunidades  $\alpha$  e duas  $\beta$  codificadas por *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. A resistência à FQ em *M. tuberculosis* é causada principalmente por mutações que ocorrem na região determinante altamente conservada (QRDR sigla em inglês) de *gyrA*. (Miotto et al., 2018).

As mutações mais comuns estão nos códons 90, 91 e 94. Outras mutações em *gyrB*, como A508S e G51R, foram relacionadas com resistência de alto nível, mas são raras. A ocorrência de resistência cruzada entre as FQ é comum. Outros mecanismos relatados incluem a superexpressão de bombas de efluxo como *pstB* (Miotto et al., 2018; Hameed et al., 2018).

Mutações nos códons 74, 88 e 91 também foram associadas à resistência à FQ. Relatos apontam que a resistência clinicamente significativa à CIP e OFX (MIC de 2 mg/L) é conferida por uma única mutação da DNA girase, enquanto que mutações duplas no *gyrA* ou mutações concomitantes de *gyrA* e *gyrB* resultam em MIC altos. (Miotto et al., 2018).

Uma análise recente encontrou resistência de baixo nível às FQ de nova geração. Isso pode ser explicado pelo uso generalizado desta classe de fármacos em outras infecções que não pelo *M.tuberculosis*. Além disso, a proposta de ponto de corte de 2,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para esta classe de fármacos foi relatado como muito alto, representando uma subestimação do nível de resistência às FQ de nova geração. (Li et al., 2014; Dookie et al., 2018).

### **Aminoglicosídeos**

- ✓ **Estreptomicina (S) – primeira linha**
- ✓ **Canamicina (CAN), amicacina (AMI) e capreomicina (CAP).**

A estreptomicina inibe a síntese de proteínas por ligação à subunidade 30S do ribossomo bacteriano causando erros de leitura da mensagem de mRNA. A resistência a S é causada por mutações na proteína S12 codificada pelo gene *rpsL* e no 16S rRNA codificado por o gene *rrs*. Mutações em *rpsL* e *rrs* são os principais mecanismos de resistência a S, representando, respectivamente, cerca de 50% e 20% dos isolados resistentes. No entanto, cerca de 20 a 30% de isolados resistentes a S com resistência de baixo nível (MIC 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) não têm mutações em *rpsL* ou *rrs*

e pode ter mutações em *gidB* que codifica uma região conservada 7-metilguanossina (mG) metiltransferase específica para 16S rRNA. (Zhang et al., 2015; Dookie et al., 2018).

Foi demonstrado recentemente que mutações na região promotora de *whiB7* contribuem para a resistência cruzada a S e CAN devido ao aumento da expressão do sistema de efluxo que é controlado por *whiB7*. Mutações no 16S rRNA *rrs* na posição 1400 causa resistência de alto nível a CAN e AMI. Isolados resistentes a S geralmente, permanecem sensíveis a CAN e AMI, porém mutações na região promotora do gene *eis*, que codifica a aminoglicosídeo acetiltransferase, causa baixo nível de resistência a CAN, mas não a AMI e mutações em *tlyA* que codifica rRNA metiltransferase e o gene 23S rRNA *rrs* (A1401G e G1484T) estão envolvidos na resistência à CAP. Como descrito acima, múltiplas mutações podem ocorrer no gene *rrs*, conferindo resistência cruzada entre estes agentes (Zhang., 2015; Dookie et al., 2018).

### 2.3 Resistência bacteriana na tuberculose

A resistência aos fármacos pelo *M. tuberculosis*, é predominantemente conferida pelo acúmulo de mutações através de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), por inserções e deleções em genes que codificam alvos dos fármacos, adquirindo novos determinantes genéticos ou pela produção de enzimas de conversão, além da resistência intrínseca. (Phelan et al., 2016).

- Resistência primária: refere-se a transmissão direta de TB resistente de uma pessoa para outra, ocorre principalmente em locais com alta prevalência de TB MDR.
- Resistência adquirida: é a mais frequente e ocorre quando o tratamento da TB é subótimo como resultado do inadequado ou incompleto regime de tratamento para tuberculose, com a seleção de bacilos mutantes resistentes, pela baixa qualidade dos fármacos, por erros de prescrição do esquema terapêutico, o uso irregular dos medicamentos, assim como os por abandonos de tratamento ou uma combinação dos fatores acima. (WHO 2018).

Assim a resistência aos fármacos em TB é resultado de uma complexa interação entre múltiplos fatores que modulam a prevalência da TB-DR, tais como: comportamentais, socioeconômicos assim como as de políticas em saúde de cada país. (Castro et al., 2017; Procop, 2017).

O fenômeno da resistência em TB não é determinado apenas por resistências devido a determinantes genéticos, mas também por fatores biológicos sujeitos às forças evolutivas, como pela resistência intrínseca que é caracterizada pela fisiologia inerente da parede celular devido a fatores estruturais e bioquímicos (Procop, 2018; Miotto et al., 2018).

As micobactérias têm uma parede celular característica que é mais espessa e mais hidrofóbica do que a maioria das outras bactérias o que as tornam altamente impermeável prevenindo a ação dos antimicrobianos para alcançar ou interagir com seu alvo favorecendo o acúmulo intracelular de antimicrobianos (Farnia et al., 2018).

Esse mecanismo de resistência é mediado por sistemas de efluxo, que ocorre através de proteínas estruturais transportadoras que atuam por bombeamento ativo de substratos do meio intracelular para o extracelular. A superexpressão de bombas de efluxo são consideradas mediadoras do aumento mutações relacionadas à resistência de alto nível a fármacos, permitindo que *M. tuberculosis* sobreviva e persista em concentrações de fármacos clinicamente relevantes, que podem levar a forma de TB-MDR. (Gillespie et al., 2002; Dookie et al., 2018).

O *M. tuberculosis* apresenta um dos maiores números de bombas de efluxo com 148 genes que codificam proteínas de transporte de membrana em seu genoma de 4,4 Mb. A contribuição desses sistemas de efluxo na aquisição de resistência a múltiplos fármacos em *M. tuberculosis* tem como exemplo, a detecção de algumas proteínas identificadas e relacionadas com baixo nível de resistência às FQ, pela interferência na ação do fármaco ao se ligar ao seu alvo celular, a DNA girase. (Warner & Mizrahi, 2006; Li et al., 2014).

Estudos indicam que o uso de inibidores de bomba de efluxo podem restaurar a atividade dos fármacos independente do nível de resistência. A combinação inibidor-fármaco diminui a concentração de fármacos expulsos pelas bombas de efluxo, diminuindo assim o MIC do fármaco. O uso desses inibidores tem sido considerado



como um adjuvante no tratamento da TB com o potencial de reduzir a duração do tratamento da TB. (Jaiswal et al., 2017; Dookie et al., 2018; Pradipta et al., 2018).

Estudos identificaram uma diversidade genética significativa do *M. tuberculosis* em microambientes ou nichos do hospedeiro que pode resultar em infecção mista com múltiplas variantes de resistência ou microevolução dentro do hospedeiro de um único isolado infectante (Castro et al., 2017; NG et al., 2019; Nimmo et al., 2020).

Na presença de um sistema imunológico adaptativo funcional, os bacilos do *M.tuberculosis* são sequestrados em granulomas onde o ambiente é caracterizado por hipóxia, pH baixo, falta de nutrientes e por substâncias orgânicas ácidas inibitórias tornando a ação dos fármacos nessas lesões um impulsionador importante da resistência dentre os vários fatores que podem afetar a dinâmica da microevolução dentro do hospedeiro. (Warner, Mizrahi, 2003; Pradipta et al., 2018; Miotto et al., 2018).

Nas lesões caseosas os bacilos de *M. tuberculosis* não se replicam e mantêm a viabilidade ao longo do tratamento, exibindo tolerância extrema a muitos fármacos de primeira e segunda linha, essa forma dormente faz com que a bactéria seja um alvo terapêutico difícil. (Evangelopoulos et al., 2015; Sarathy et al., 2018).

Outras características como a genética do hospedeiro, a idade dos pacientes, a dosagem do medicamento, as interações medicamentosas, as interações alimentos-medicamentos e comorbidades, como o HIV e diabetes modulam ainda mais os níveis de antimicrobianos presentes. Tal heterogeneidade é específica do fármaco, tendo em vista que diferentes fármacos têm diferentes mecanismos de ação que contribuem para uma pressão variável do fármaco em diferentes subpopulações de *M. tuberculosis* no hospedeiro (Castro et al., 2017; Pradipta et al., 2018).

Como consequência da evolução da resistência ocorre o fenômeno da heterorresistência na dinâmica populacional dos bacilos do *M. tuberculosis*, que pode manifestar por meio de dois mecanismos diferentes nessas infecções (Castro et al., 2017; Koch et al., 2018).

1. Por mutação espontânea em uma população inicialmente monoclonal e sensível aos fármacos;

2. Por infecções policlonais que pode ser infecções mistas. Infecções mistas possuem dois clones diferentes e que infectam um determinado paciente simultaneamente, que podem levar a heterorresistência se um dos clones for um mutante resistente e o outro for sensível ao fármaco (Castro et al ., 2017).

Em ambas situações a heterorresistência é um subproduto de um mutante que emergiu de uma população inicialmente sensível. A seleção ocorre durante a exposição intermitente a fármacos em níveis subterapêuticos, inicialmente produzindo populações bacterianas heterorresistentes e finalmente totalmente resistentes (Castro et al., 2017; Koch et al., 2018).

Com relação à capacidade de detecção laboratorial da heterorresistência, esta é dificultada pelos baixos níveis nessas populações, uma vez que ocorre a uma frequência abaixo do nível de detecção dos principais métodos, da sensibilidade do teste. Atualmente, os métodos genotípicos como a amplificação por PCR seguido por técnica polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP, sigla em inglês), sequenciamento de DNA e WGS possuem maior sensibilidade quando comparado com os métodos fenotípicos tradicionais (Muller et al., 2013; Castro et al., 2017; Pradipta et al., 2018).

#### ✓ **Fatores que influenciam na resposta terapêutica da TB.**

Alguns fatores também devem ser considerados e associados ao surgimento da resistência que são relacionados aos regimes de tratamento e dosagens padronizadas que são administradas independentemente da localização e da gravidade da doença, de patologias pulmonares e coinfeção TB-HIV (pessoa que vivem com o HIV tem problemas de mal-absorção, com alteração do metabolismo dos fármacos, ou interações com a terapia antiretroviral) e outras comorbidades graves dado a complexidade das formas da doença, e podem comprometer o controle da TB com conseqüente surgimento de resistências aos fármacos. (Heysell & Friedland, 2019).

Atualmente, a maioria dos pacientes que recebem tratamento para TB-RR recebem regimes de segunda linha com base em um único resultado genotípico de resistência a RIF, em vez de um perfil de resistência a todos os fármacos que

compõem o tratamento para TB de primeira e segunda linha (WHO 2018; Miotto et al., 2018; Dookie et al., 2018).

Este único resultado genotípico assume que uma gama de mutações na região determinante de resistência do gene *rpoB* conferem o mesmo grau de resistência a R e ignora as complexidades na interpretação dos resultados de TS (Pradipta et al., 2018).

As complexidades dos TS não são evidentes para a maioria dos clínicos que recebem um resultado com laudo dicotômico resistente/sensível. Esses resultados geralmente são de uma única amostra, e são utilizados para prescrever um regime de segunda linha padronizado ou, menos frequentemente em ambientes de alta prevalência, criar regimes baseados em uma classificação de medicamentos recomendada pela OMS (Koch et al., 2018).

Nesse sentido, é desejável fornecer mais detalhes nos relatórios, como a presença de alguma mutação que idealmente deve ser complementada com o nível de concentração do fármaco (Richter et al., 2009; Domínguez et al., 2016).

A abordagem individualizada para o gerenciamento de formas de TB-DR é o cenário ideal. No entanto, para ambientes de alta prevalência com recursos limitados, a realidade permanece deficiente e ainda não oferece acesso necessário ao diagnóstico e tratamento da TB.

Como exposto acima, a OMS sugere aumento de dose para INH, quando o gene *inhA* é detectado porque possivelmente o nível de resistência é baixo. Outros dados sugerem que as dosagens de RIF também podem ser aumentadas. (Folvardensen et al., 2013; Castro et al., 2017; WHO 2018; Schön et al., 2020). Idealmente, testes como o WGS que detectaria heterogeneidade diretamente de amostras biológicas (Nonghanphithak et al., 2020) poderia interferir no esquema terapêutico com maiores possibilidades de sucesso clínico e evitaria o surgimento de resistência. No entanto, para ser viável em muitos locais, novas abordagens de diagnóstico precisariam ser automatizadas e capazes de ser conduzidas, pelo menos, em laboratórios descentralizados. (Hoffner 2013; Walzl et al., 2018; Hameed, 2018; Heysell & Friedland, 2019; Schon et al., 2020).

## 2.4 Diagnóstico laboratorial

### 2.4.1 Microscopia - baciloscopia

As espécies de *Mycobacterium* e os membros do gênero *Nocardia*, são classificadas como bactérias ácido-resistentes devido à sua impermeabilidade a alguns corantes, como exposto acima.

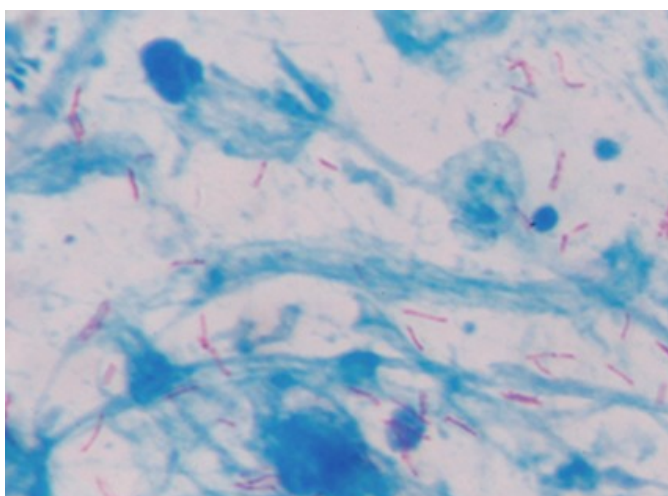
- ✓ Método Ziehl-Neelsen (ZN): é o mais utilizado no mundo por sua simplicidade e praticidade. O esfregaço é fixado e corado com um corante alcalino, a carbol fucsina, com necessidade de aquecimento para facilitar a penetração do corante na parede celular e após, aplica-se uma solução de álcool ácido que atua como descorante. Depois é contra corado com azul de metileno. Os bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) aparecem rosa em um fundo azul contrastante.
- ✓ O método Kinyoun é uma versão do ZN em que não há aquecimento, sendo denominada coloração a frio, e que necessita de quantidade aumentada de fenol na solução para melhorar a entrada do corante na parede celular (Procop, 2018).

Esse método possui baixa sensibilidade, detectando apenas de 60% a 80% dos casos de TB em adultos na fase ativa, pois há necessidade de uma concentração entre 5.000 a 10.000 células bacterianas/mL de amostra clínica. Essa limitação deve ser considerada na avaliação dos resultados de ZN de amostras clínicas suspeitas. A sensibilidade em amostras de crianças e em pacientes com o HIV é ainda menor. Assim, baciloscopias negativas não devem excluir diagnóstico de TB (WHO 2018; Procop, 2018).

O resultado da baciloscopia com pesquisa de B.A.A.R positiva deve ser considerado altamente suspeito de infecção por *M. tuberculosis* e deve ser associado com outros parâmetros clínicos para o diagnóstico definitivo de TB. Outra limitação do ZN é que outras micobactérias não tuberculosas (MNT) também são coradas e não podem ser distinguidas do CMTB somente pelo resultado da baciloscopia e não tem poder discriminatório entre bacilos viáveis e não viáveis. Outra resposta que a baciloscopia

permite a observação de agregação de bacilos álcool-ácido resistente numa superestrutura que é denominada fator corda e é altamente sugestiva de *M. tuberculosis* (Procop 2018; Shenai, 2015).

**Figura 5:** Morfologia dos bacilos do *M.tuberculosis* corado pelo método Ziehl-Neelsen



Autor: CDC/Dr. George P. Kubica

✓ Método AURAMINA O (AU) – microscopia fluorescente.

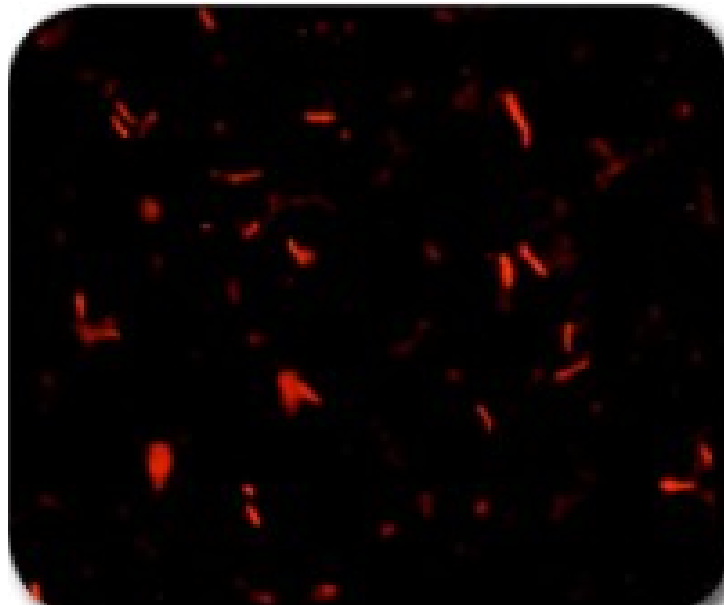
A identificação de micobactérias com o corante fluorescente auramina O é baseada na afinidade do fluorocromo aos ácidos micólicos na parede celular. Auramine O é excitado por luz azul e emite na região de ~ 500 nm para ~ 650 nm.

A microscopia de fluorescência tem algumas vantagens importantes:

- as imagens de fluorescência de alto contraste permitem uma detecção mais fácil dos bacilos.
- o uso de lentes de baixa a média potência (normalmente 10x, 20x e 40x) permite um campo de visão maior do que microscopia convencional, onde normalmente uma lente 100x é usada, assim aumenta sua sensibilidade.
- o método de coloração com fluorocromo é mais simples do que o método ZN.

**Figura 6:** Morfologia dos bacilos do *M. tuberculosis* corados pelo método auramina.

Coloração com fluorocromo (auramina-rodamina)



*A Clinician's Guide to the TB. Laboratory. Heartland National TB Center*

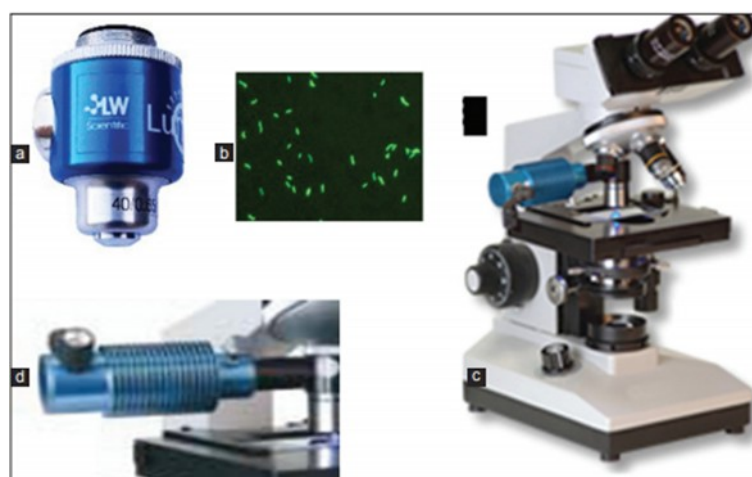
✓ Microscopia de emissores de luz (LED).

A microscopia LED foi desenvolvida para países com recursos limitados para oferecer os benefícios de microscopia de fluorescência sem custos associados. Conforme mostrado na figura 3, um pequeno acessório de LED pode facilmente converter qualquer microscópio óptico, de luz composto, em microscópio de fluorescência. Comparado ao vapor de mercúrio de microscópios fluorescentes usados para o método AO, a microscopia LED têm longa vida, menos necessidade de manutenção, menos gasto de energia, podendo ser capazes de funcionar com baterias. Essas qualidades os tornam 60% mais baratos e viáveis para uso em

locais com poucos recursos. Ese método permite avaliar uma área maior do esfregaço, o que resulta em uma maior rapidez e sensibilidade 10 vezes maior. (Migliori, G B., et al 2017).

A OMS aprovou a substituição da baciloscopia convencional por métodos fluorescentes e microscopia LED. Em áreas com baixas taxas de TB-MDR ou TB associada ao HIV, considerações de custo-efetividade favorecem o uso da microscopia LED como diagnóstico inicial com melhor desempenho da microscopia (WHO 2020c).

**Figura 7:** Microscópio de emissores de luz-LED



OMS 2020c

## 2.4.2 Cultura

### 2.4.2.1 Métodos fenotípicos manuais

- ✓ Meio Löwentin-Jensen (LJ), com base incorporada com ovo e verde de malaquita, que é um inibidor de crescimento de contaminantes da microbiota orofaríngea.
  
- ✓ Meios semi-sintéticos, formulados em base de ágar suplementado com OADC (*Oleic Albumin Dextrose Catalase*) substâncias que favorecem o crescimento do

MTB: Middlebrook 7H9 em meio líquido, ágar Middlebrook 7H10 e ágar Middlebrook 7H11.

Atualmente a cultura em meios sólidos e líquidos é o padrão ouro para detecção laboratorial da TB. Possui elevada sensibilidade e especificidade com limites de detecção de 10-100 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL de amostra clínica. Os meios recomendados são o Löwenstein Jensen (LJ), ágar 7H10 e 7H11. Nos casos com baciloscopia negativa, observa-se um aumento de 30% na capacidade de detecção *in vitro* por cultura (WHO 2018).

O meio LJ tem como vantagem o baixo custo e baixo índice de contaminação, porém o crescimento bacteriano visível na superfície do ágar ocorre após 14 a 30 dias de incubação. As propriedades de crescimento e morfologia são usadas para classificação preliminar das micobactérias. As características são de colônias rugosas, despigmentadas ou cremes (Procop, 2018).

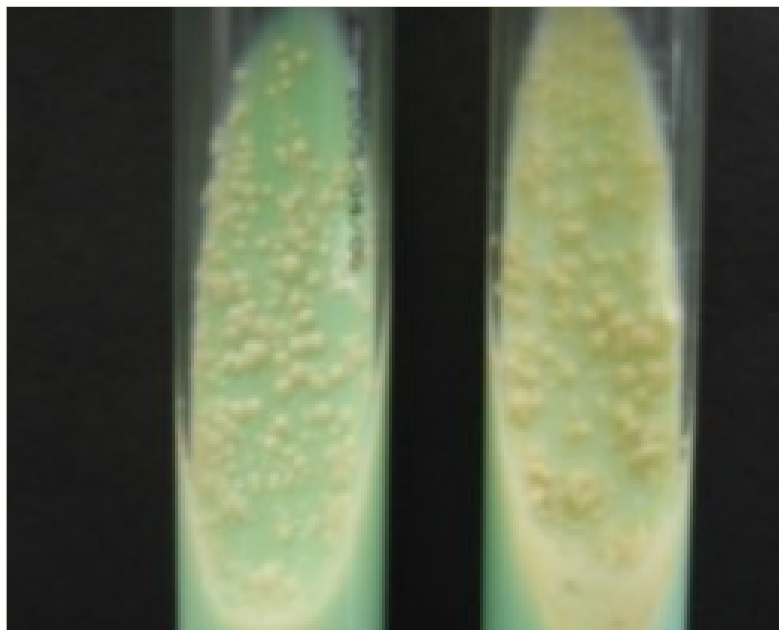
**Figura 8:** Colônias com aspecto serpentiginoso de *M. tuberculosis* em meio Löwenstein-Jensen



*A Clinician's Guide to the TB. Laboratory. Heartland National TB Center*

**Figura 9:** Colônias do *M. tuberculosis* em meio Löwenstein-Jensen.





*A Clinician's Guide to the TB. Laboratory. Heartland National TB Center*

#### 2.4.2.2 Métodos automatizados

- ✓ **BACTEC™ Mycobacterial Growth Indicator Tube™ 960 (MGIT Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA).**

O Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT) utiliza meio líquido Middlebrook 7H9 para o crescimento e o isolamento de micobactérias e contém um composto fluorescente envolvido em silicone misturado ao meio que detecta a emissão de fluorescência pelo consumo de oxigênio quando há crescimento do *M. tuberculosis*, tornando a detecção de crescimento indiretamente, o tempo necessário para liberação dos resultados é de uma a três semanas para um resultado positivo e até 6 semanas para um resultado negativo. (Bremer et al., 2002).

No entanto, a cultura em meio líquido pelo MGIT, não é usada como um teste diagnóstico primário em muitos países com alta prevalência tendo em vista os altos custos, pelo requisitos como infraestrutura laboratorial de nível de biossegurança 3 (NB3), equipe técnica qualificada e programas de controle de qualidade rigorosos. (WHO 2020c).

Ainda assim, a microscopia convencional e cultura são necessários para monitorar a resposta do paciente ao tratamento.

✓ **BacT / ALERT 3D BacT/Alert 3D system (Organon Teknika, Durham, N.C.)**

O BacT / Alert 3D (anteriormente conhecido como MB / BacT) é um sistema de monitoramento contínuo não radiométrico com um gerenciamento de banco de dados informatizado. O meio líquido Middlebrook 7H9 suplementado com uma mistura de OADC (Ácido Oleico, Albumina, Dextrose, Catalase), Polimixina B, Anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima, vancomicina e azlocilina é adicionada no momento do uso. O sistema é baseado na detecção de CO<sub>2</sub> pelo metabolismo micobacteriano. Os frascos têm um sensor na parte inferior do frasco que são monitorados continuamente. Quando ocorre a mudança de cor do sensor pela produção de CO<sub>2</sub>, ocorre a emissão de um alerta sonoro e visual que indica crescimento microbiano. (Carricajo et al., 2001).

Os estudos que avaliaram o BacT / Alert D, concluíram que esse sistema foi mais rápido e mais sensível do que os meios tradicionais, enquanto comparação com outros sistemas automatizados e semiautomáticos não revelaram diferenças significativas. (Shenai S 2017).

Apesar das desvantagens, o TS fenotípico baseado em cultura permanece essencial para aqueles fármacos para os quais não existem testes genotípicos confiáveis no momento, mas para os quais existem métodos fenotípicos, como exemplo para a BDQ. Além disso, o TS fenotípico pode ser necessário mesmo para fármacos para os quais existem testes genotípicos, para a investigação de resultados discordantes (WHO 2018).

---

### 2.4.3 Identificação bioquímica

#### 2.4.3.1 Métodos fenotípicos

Os principais testes utilizados na rotina são: produção de niacina, a capacidade de redução do nitrato a nitrito, o tempo de crescimento em cultura e inativação da catalase a 68°C. Além desses há outros como a inibição de crescimento em TCH (hidrazida de ácido tiofeno-2-carboxílico), a observação da produção de pigmentos carotenóides em cultura são usados para diferenciá-lo de outras micobactérias. (WHO 2018; Azadi et al., 2018). 1.4.3.2

#### 2.4.3.2 Métodos genotípicos

O crescimento lento, a severidade da doença, algumas dificuldades de diagnóstico por métodos fenotípicos, torna a utilização de métodos genotípicos para o diagnóstico da TB um recurso técnico que agrega eficácia ao diagnóstico laboratorial (Neonakis et al., 2008; Hoffner 2013; Procop, 2018). Com a liberação mais rápida dos resultados, apresentam vantagens como a redução de custos ao permitir um tratamento mais efetivo na TB-MDR, controle na disseminação da doença além de uma melhor condução para avaliação de isolamento respiratório em hospitais ou outras instituições. (CDC > Tuberculosis TB).

Em 2019 a OMS revisou e aprovou novos testes genotípicos e recomendou que todos devem ser usados como teste inicial de diagnóstico e pesquisa de resistência à RIF para minimizar atrasos do início de um tratamento adequado, em substituição à baciloscopia e aos testes fenotípicos de TS e direcionados principalmente às populações de regiões com alta prevalência de HIV e TB-MDR assim como para a detecção de algumas formas de doenças extrapulmonares. (WHO 2020c).

Testes genotípicos rápidos não são recomendados como testes para monitorar o tratamento, porque a presença de bacilos mortos pode gerar um resultado positivo. Assim, a microscopia e cultura devem ser usadas para monitoramento, de acordo com as diretrizes nacionais e recomendações da OMS. (WHO 2020c).

**A) Gene Xpert® MTB/RIF e GeneXpert® MTB/RIF Ultra (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA).**

Esses testes foram recomendados pela OMS em 2010 para diagnóstico simultâneo da TB e da TB-RR (resistente à RIF), GeneXpert®MTB/RIF Ultra foi direcionado principalmente aos indivíduos infectados pelo HIV, por ter maior sensibilidade.

Trata-se de testes baseados na amplificação de ácidos nucleicos para a detecção de DNA do *M. tuberculosis*, bem como de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) do gene *rpoB* na região determinante de resistência à RIF (DR-RR da sigla em inglês) que abriga mais de 95% das mutações responsáveis por essa resistência, essas reações são realizadas simultaneamente, e diretamente de amostras clínicas em tempo real. (Domínguez et al., 2016).

A recomendação da OMS para seu uso a nível global tem como objetivo a substituição da bacterioscopia para possibilitar a identificação rápida de possíveis casos de TB-MDR. Na maioria dos casos a resistência a RIF é um preditor de TB-MDR, que pode coexistir com a resistência a INH com consequente impacto na adequação de um tratamento personalizado com fármacos de segunda linha. (WHO 2020b; Procop 2017).

Entretanto não podem ser usados para testes de acompanhamento ou monitoramento de pacientes em tratamento, pois eles detectam bacilos vivos e mortos. Além disso, a interpretação de resultados "muito baixos" e "traços" em pacientes com TB pode exigir uma avaliação clínica adicional e ferramentas adicionais para excluir um resultado falso-positivo.

### **Procedimentos técnicos**

É realizado em uma plataforma automatizada, com execução simples e liberação do resultado em aproximadamente 2 horas. Possui sensibilidade de 92% para detectar o *M. tuberculosis* e 99% para detectar resistência à RIF. (Shenai S, 2015; Procop 2016; WHO 2011b). Não exige infraestruturas laboratoriais complexas e alto nível de biossegurança o que permite seu uso em laboratórios periféricos. (WHO 2011)

Embora raras, os isolados de *M. tuberculosis* com mutações que conferem resistência à RIF localizadas fora da DR-RR foram observadas clinicamente e seriam perdidas por este teste. O GeneXpert®MTB/RIF infere a presença de mutações por meio da ausência do tipo selvagem e pode dar um resultado de resistência na presença de mutações silenciosas. (Koch et al., 2018).

**Figura 10:** Equipamento GeneXpert®MTB/RIF



OMS 2020c

O GeneXpert®MTB/RIF Ultra usa a mesma plataforma GeneXper®tMTB/RIF e foi desenvolvido para melhorar a sensibilidade e confiabilidade da detecção de resistência do CMTB à R. Esse método usa dois alvos de amplificação multicópia (IS6110 e IS1081) e uma câmara de reação de PCR maior. O GeneXpert®Ultra tem uma sensibilidade em torno de 16 unidades formadoras de colônias UFC/mL enquanto a do GeneXpert®MTB/RIF é de 131 UFC/ mL. Além disso, esse método permite discriminar melhor as mutações silenciosas das que conferem resistência, minimizando resultados falsos positivos de resistência à RIF, especialmente em amostras com baixa concentração bacteriana como as de pessoas com coinfeção por HIV, em amostras pediátricas e extrapulmonares. (WHO 2020c).

**B)Truenat™ MTB, MTB Plus e Testes MTB-RIF Dx (Molbio Diagnostics, Goa, Índia).**

São ensaios automatizados, realizados em tempo real e baseados em testes por PCR com micro *chip* para extração, amplificação e detecção dos *loci* de DNA genômico específico para a detecção semiquantitativa de CMTB diretamente de espécimes de escarro, e mutações relacionadas a resistência a rifampicina, com liberação dos resultados em menos de uma hora.

Foram projetados para serem implantados em laboratórios periféricos com infraestrutura mínima e técnicos minimamente treinados.

**Figura 11:** Equipamento Truenat MTB, MTB Plus and MTB-RIF Dx assays



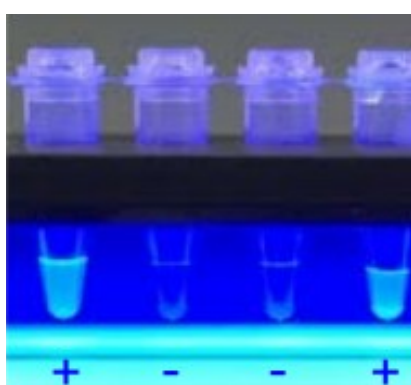
OMS 2020c

### **Teste de amplificação isotérmica (TB-LAMP; Eiken Chemical, Tóquio, Japão)**

O teste TB-LAMP foi proposto para detectar o CMTB diretamente de espécimes de escarro. Este é um ensaio manual que requer menos de 1 hora para sua execução. Não requer instrumentação sofisticada e pode ser usado ao nível do centro de saúde periférico, dado que os requisitos de biossegurança são semelhantes à baciloscopia. TB-LAMP não detecta resistência aos fármacos anti-TB.

Há considerações importantes para avaliar a implantação do seu uso: O teste TB-LAMP é recomendado para substituir a baciloscopia preferencialmente em locais com baixa prevalência de HIV e TB-MDR, pois o ensaio TB-LAMP não realiza pesquisa sobre resistência à R.

**Figura 12:** Teste de amplificação isotérmica TB-LAMP



OMS 2020c

O ensaio de lipoarabinomanano de fluxo lateral é baseado em biomarcador (LF-LAM) (Alere Determine™ TB LAM Ag, EUA) de imunocaptura com base na detecção do antígeno LAM micobacteriano na urina, um resultado LF-LAM positivo é considerado como confirmação bacteriológica da TB nesses pacientes.

A sua recomendação é direcionada principalmente para ambientes hospitalares, para auxiliar no diagnóstico de TB ativa em adultos, adolescentes e crianças HIV positivos com sinais e sintomas de TB (pulmonar ou extrapulmonar) e com doença avançada por HIV ou que estão gravemente doentes, ou com uma contagem de células CD4 de menos de 200 células / mm<sup>3</sup> , independentemente dos sinais e sintomas de TB.

## 2.5 Testes de sensibilidade aos fármacos antituberculose (TS)

### 2.5.1 Métodos fenotípicos

Dois abordagens para TS frente ao *M. tuberculosis* são atualmente empregadas: método da proporção em ágar baseado em concentração crítica (CC) e a metodologia baseada em MIC que determina o nível de resistência de um determinado fármaco (Gilpin et al., 2016).

#### 2.5.1.1 Método da Proporção indireta (MP)

MP é um dos testes laboratoriais mais comuns e considerado padrão ouro para testar a sensibilidade de fármacos anti-TB em isolados do *M. tuberculosis*, foi originalmente proposto por (Canetti et al., 1963) e modificado posteriormente (WHO 2018). O tempo para obtenção dos resultados do MP é de 28 a 42 dias, essa demora representa um risco potencial para o início de uma terapia adequada e eficiente, e que pode favorecer disseminação da doença e o controle da TB (WHO 2018).

A resistência para este método é definida pelo crescimento de  $\geq 1\%$  (10% para a pirazinamida) de um inóculo bacilar na concentração crítica de um fármaco, implicando que não haverá resposta terapêutica a esse fármaco e inversamente qualquer cultura que mostrar  $< 1\%$  de crescimento em um meio contendo uma concentração crítica pré-definida para cada fármaco testado e comparada com o crescimento em um controle sem o fármaco é considerada sensível (Canetti et al., 1969; WHO 2018).

A concentração crítica e a proporção crítica são os critérios para interpretação dos resultados.

Os principais problemas de interpretação e desvantagens com a definição de CC utilizada até 2018 são os seguintes: primeiro, no TS baseado em cultura, a resistência era definida como a capacidade de detecção > 1% da população do *M. tuberculosis* do tipo selvagem (10% para pirazinamida (Z) em crescer na ou acima de uma CC pré-definida do fármaco e segundo, dados de resultados clínicos de fármacos individuais na maioria das vezes não estão disponíveis para avaliar a eficácia do tratamento, já que o tratamento é realizado com múltiplos fármacos (Bottger 2008; Cambau 2010; Miotto et al., 2017).

Para a maioria dos fármacos, apenas um único valor de CC é usado. Isso resulta na classificação binária de uma amostra de *M. tuberculosis* como resistente ou sensível, e exclui a determinação do nível de resistência associado a uma amostra particular (Bottger 2011).

Em muitos sistemas comerciais, o inóculo no meio sem fármaco é uma diluição de 1:100 do inóculo no meio contendo fármaco refletindo o MP. É importante observar que a resistência, conforme definido aqui, é um termo técnico: não corresponde à resistência clínica e não deve ser confundido com resistência mutacional, o principal indutor de resistência adquirida em *M. tuberculosis*. Em combinação com a CC, a proporção crítica é um termo laboratorial usado em TS *in vitro* para definir o ponto de corte epidemiológico (Domínguez et al., 2016).

Consequentemente, os pacientes infectados com isolados de *M. tuberculosis* com baixos níveis de resistência e que poderiam se beneficiar com o uso de uma dosagem mais alta de um fármaco não seriam beneficiados com um tratamento mais eficaz e menos tóxico. (WHO 2018).

Após várias abordagens de alguns pesquisadores (Gumbo et al, 2010), as CC até então, não tinham sido revisadas, desconsiderando por exemplo, a avaliação do impacto das variações genéticas ao longo do tempo e o surgimento de vários determinantes de resistências aos fármacos investigados. (Kaniga et al., 2018).

Em 2017, a OMS iniciou um processo sistemático para reavaliar as CC atuais de fármacos anti-TB que estão em uso na prática clínica assim como de novos fármacos reintroduzidos em esquemas terapêuticos para o tratamento de TB-MDR.



Em 2018 a OMS divulgou uma nova definição para CC de um agente anti-TB que foi adotada e modificada a partir dessa convenção (WHO 2018).

A nova definição de CC foi assim descrita: “A concentração crítica é definida como a concentração mais baixa de um agente anti-TB *in vitro* que irá inibir o crescimento de 99% (90% para a pirazinamida) de isolados fenotipicamente do tipo selvagem do CMTB”.

Assim, a OMS adotou uma abordagem prática reduzindo as CCs que estavam claramente acima do valor de corte epidemiológico, como as CC de RIF pelo método 7H10 e MGIT mas mantendo as CCs restantes. (Schön et al., 2020; WHO 2021a).

A nova definição dos valores de CC para fármacos individuais são maiores do que os valores de cortes epidemiológicos (ECOFFs), que representam a maior concentração da distribuição de MIC do tipo selvagem, definição proposta pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) em 2020 (Miotto et al., 2018; WHO 2018; Schön et al., 2020).

Há evidências de que algumas CCs definidas a nível fenotípico pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e pela OMS até então, são maiores do que os valores de corte epidemiológicos (ECOFFs). Como resultado, alguns isolados com MICs elevados em comparação com os ECOFFs devido a mutações conhecidas são classificados como sensíveis, embora os dados de farmacocinética / farmacodinâmica sejam limitados ou não há resultados clínicos de que esses isolados ainda podem ter uma resposta terapêutica favorável. (Heyckendorf et al., 2018). Além disso, há concentrações que ficam acima daquelas de isolados do tipo selvagem que são desprovidas de mecanismos de resistência, o que pode levar a artefatos nos pontos de corte (Koch et al., 2018; Heyckendorf et al., 2018; Schön et al., 2018).

2.5.1.2 Métodos automatizados – plataforma de macrodiluição BACTEC™ Mycobacterial Growth Indicator Tube™ 960 (MGIT Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)

O BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE é um teste qualitativo que fundamenta no crescimento de isolados de MTB num tubo contendo fármaco e comparado com um tubo controle sem fármaco (Controle de Crescimento). Nesse sistema, o crescimento

bacteriano é precocemente detectado pelo consumo de oxigênio com liberação de fluorescência. A análise da fluorescência no tubo contendo fármaco, comparativamente com a fluorescência presente no tubo controle de crescimento, é utilizada para determinar os resultados do TS. A interpretação é automática, com a liberação de relatórios com os resultados de sensibilidade ou de resistência. (Bemer et al., 2002).

As concentrações críticas para o ensaio SIRE são 0,10 µg / ml para I (INH), 1,0 µg / ml para RIF, 5,0 µg / ml para E e 1,00 µg / ml para S, acrescidos de 2 tubos, um contendo meio de crescimento sem fármacos para controle de crescimento do MTB e outro contendo meio de cultura com p-nitrobenzeno (PNB) que inibe o crescimento do MTB, mas não o de micobactérias não tuberculosas (MNT) para diferenciação de espécies.

Esse método tem como vantagens a realização de um número maior de exames e um tempo menor de liberação dos resultados em cerca de 7 a 14 dias quando comparado com o MP, mas o seu custo relacionado aos insumos que são importados, a necessidade de manutenção de uma infraestrutura laboratorial complexa com controles de qualidade rigorosos e de uma equipe especializada o que torna a sua implantação difícil em países em desenvolvimento (Brandão et al., 2019).

#### 2.5.1.3 Métodos de Determinação da Concentração Inibitória Mínima - MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*)

A segunda abordagem usada em TS ao *M. tuberculosis* é realizada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (MIC) que é definida como a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede o crescimento de mais de 99% de um microorganismo em diluição em meio sólido ou em caldo (OMS 2018).

Essa definição amplia a definição de CC do MP que utiliza apenas uma concentração ou no máximo duas e somente para alguns fármacos como INH e S. Fornece um

relatório qualitativo e binário (sensível / resistente), que embora importante e útil para o tratamento, não informa sobre o nível de resistência, em contraste, a determinação do MIC permite avaliar com mais precisão os dados relativos do TS. (Kaniga et al., 2016).

Em 2010 a OMS recomendou o uso de métodos fenotípicos com custos mais acessíveis e com configurações para serem utilizados em locais com acesso limitado à uma infraestrutura laboratorial sofisticada e tecnicamente mais fáceis com o objetivo de implantação como métodos laboratoriais em diagnósticos de TB em países onde a TB e a TB-MDR são problemas e desafios de saúde pública e onde os ensaios automatizados ou genotípicos não estão disponíveis (WHO 2011a).

Os métodos não comerciais recomendados foram o *Nitrate Reductase assay* (NRA) os métodos indiretos baseados na redução de um corante indicador de crescimento, como o *Resazurin Microtitre Assay* (REMA) que utiliza os indicadores redox Alamar Blue ou a resazurina e [3 (4,5-dimetiletil-tiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio] (MTT), e o *Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay* (MODS) sendo os três últimos para determinação do MIC de fármacos de primeira e segunda linha. (WHO 2011a; Shenai, S 2015).

Esse métodos são adequados para uso em laboratórios de nível central ou laboratórios de referência e exigem pessoal altamente treinado. No entanto, seu uso não se destina a substituir a cultura convencional e o TS. (WHO 2020c).

#### 2.5.1.4 Métodos Colorimétricos

Os testes colorimétricos com indicador de crescimento por meio de reação de oxirredução são métodos indiretos baseados na redução de um indicador de crescimento colorimétrico adicionado a meio de cultura líquido em uma placa de microtitulação após exposição de isolados do *M. tuberculosis* frente à fármaco anti-TB in vitro.

##### 2.5.1.4.1 REMA (*Resazurin Microtitre Assay*) e MTT (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2, 5-difenil tetrazólio)

Esses métodos avaliam a MIC de fármacos anti-TB após o isolado clínico do *M. tuberculosis* ter sido exposto *in vitro* a diferentes fármacos com uma gama de concentrações. A resistência é detectada por uma mudança na cor do indicador adicionado ao meio e que é proporcional ao número de micobactérias viáveis no meio. (WHO 2011a).

O REMA e o MTT utilizam a capacidade de células micobacterianas viáveis para reduzir os corantes pelo metabolismo durante o crescimento celular. A mudança de cor dos corantes pela atividade metabólica ocorre por meio da reação de oxidação-redução dos corantes. A resazurina muda de cor de azul (estado oxidado) para rosa (estado reduzido) e o MTT é reduzido pela desidrogenase da cor amarela (estado oxidado) para produzir MTT formazan de cor roxa, que pode ser solubilizado e lido visualmente ou quantificado por medição espectrofotométrica em 570 nm. (Foongladda S et al., 2002; Palomino JC et al., 2002; Martin A et al., 2007).

Existe uma correlação direta entre a redução da resazurina e do MTT no meio de crescimento e a concentração de organismos vivos. Os resultados podem ser determinados entre 8 a 14 dias (WHO 2011a).

O tempo para detecção de TB-MDR pode não ser necessariamente mais rápido com teste indireto e nenhum deles foram recomendados para detectar TB-XDR. (Shenai, S et al., 2015).

#### 2.5.1.4.2 MODS (*Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay*).

O ensaio de observação microscópica de sensibilidade aos fármacos MODS, é baseado em três princípios: 1) *M. tuberculosis* cresce mais rápido em meio líquido do que em meio sólido 2) o crescimento microscópico de *M. tuberculosis* em meio líquido é característico de *M. tuberculosis*, permitindo que ele seja diferenciado de micobactérias atípicas ou contaminação fúngica ou bacteriana 3) os fármacos de primeira e segunda linha podem ser incorporados ao ensaio MODS para permitir a detecção direta e simultânea de TB-MDR, evitando a necessidade de subcultura para realizar TS indireto. (Brady MF et al., 2008).

A técnica consiste na inoculação de amostras clínicas em meios livre e com concentrações seriadas de fármacos que após incubação é avaliado por microscópico invertido observando o crescimento de microcolônias e formação de

fator corda típica de *M. tuberculosis* em placas de microtitulação. (Park WG et al., 2002; Brady MF et al., 2008).

O crescimento simultâneo em meios sem e com fármacos indica uma cultura positiva e resistência aos fármacos incorporados. Foi recomendado pela OMS como alternativa de TS na avaliação do MIC de fármacos anti-TB, pode ser realizado como um teste direto ou indireto. (WHO 2011a).

#### 2.5.1.4.3 Nitrate Reductase assay (NRA)

O método de nitrato redutase - NRA é uma técnica baseada na capacidade do *M. tuberculosis* em reduzir o nitrato ( $\text{NO}_3$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2$ ) como indicador de viabilidade celular por meio da atividade da enzima nitrato-redutase, que é detectada pela adição de uma solução reveladora adicionada ao meio e que produz uma reação com cor que indica indiretamente a presença do *M. tuberculosis*. O meio LJ para este método é preparado com incorporação de solução de nitrato de potássio a 1 mg / mL ( $\text{KNO}_3$ ). (Angëby, et al., 2002; Musa, et al., 2005).

Esse método pode ser realizado utilizando isolados clínicos do *M. tuberculosis* em cultura denominado método indireto (NRA-I) e diretamente de amostras clínicas respiratórias com baciloscopia positiva (NRA-D) (WHO 2011).

## 2.6 Antecedentes científicos do MIC-REMA

A avaliação de resultados de TS pelo MIC fornece informações importantes para um tratamento eficaz e direcionado, essa demanda é particularmente importante com a disseminação da TB-MDR. Ao fornecer resultados quantitativos, esse pode demonstrar alterações sutis na sensibilidade de alguns fármacos que podem associar-se com falhas terapêuticas, especialmente quando o resultado está no limite da faixa que separa isolados sensíveis de resistentes. A avaliação de resultados de MIC permitem determinar pontos de corte clínico para auxiliar na

determinação de pontos de interrupção utilizando modelos estatísticos para definição desses valores. (Zheng X et al., 2016)

Em uma avaliação com 150 isolados, o desempenho do REMA para os cinco fármacos de segunda linha CAN, CAP, OFX, ETH e PAS foi comparado com o MP. A especificidade foi de 100% para os cinco fármacos e a sensibilidade variou de 96,8% a 100%, para CAP a sensibilidade foi de 84,2%. (Martin A et al., 2003).

O método MIC-REMA foi avaliado em uma revisão sistemática e meta-análise que utilizou 18 estudos para detecção de resistência à RIFe 16 para INH, que utilizou isolados clínicos de cultura. Para os dois fármacos, todos os estudos apresentaram sensibilidade e especificidade que variaram entre 89% e 100%. (Martin A et al., 2011).

Em outro estudo realizado num centro de referência no Brasil o método MIC-REMA foi comparado com o MGIT-960 kit SIRE. A amostra tinha uma proporção de aproximadamente 50% de isolados MDR. Os resultados mostraram excelente concordância para H, sem resultado discordante. Para R houve apenas um resultado discrepante, o que resultou numa diminuição da sensibilidade mas com excelente especificidade. (Miyata M et al., 2013).

De acordo com os estudos avaliados, o MIC-REMA mostrou-se um método rápido e com custos mais acessíveis quando comparado com outros métodos fenotípicos como o MP, MGIT-960 kit SIRE e com o MycoTB (Jaglal P et al., 2018).

O método GenoType®MTBDRplus v2 é um dos principais testes que faz parte das recomendações da OMS para um melhor enfrentamento da TB. É indicado para a detecção rápida do *M tuberculosis* e dos principais genes associados à resistência à RIF e INH com o objetivo de melhorar a capacidade diagnóstica laboratorial, com respostas eficientes para um melhor manejo do tratamento e conseqüentemente para o controle da TB (WHO 2020c).

2.7 Considerações sobre resultados de MIC versus detecção de genes de resistência em *M. tuberculosis*

Os mecanismos de resistência diferem em sua capacidade de aumentar o MIC, assim pode-se correlacionar valores de MIC com algumas mutações específicas (Schön et al., 2020).

Mesmo com a detecção de mutações para alguns isolados, mas com resistência de baixo nível, o uso de doses mais altas de alguns fármacos está associado a uma boa resposta terapêutica, sem a necessidade de mudança no regime de tratamento e consequentemente evita a seleção de mutantes resistentes. Dentre os fármacos que podem ser usados doses mais altas estão RIF, INH e FQ (Ängeby K.K et al., 2012; Koch et al., 2018; Miotto et al., 2018; WHO 2021b).

A resistência de baixo nível deve ser identificada testando concentrações mais altas do que a CC. Foi demonstrado que, na maioria dos casos, os pacientes responderam ao tratamento com doses de fármacos maiores que as padronizadas, destacando a necessidade de utilização de duas concentrações ou estabelecendo uma categoria intermediária. Por exemplo, testes para INH em duas concentrações para diferenciar a resistência de alto e baixo nível já são recomendadas pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI), mas não são rotineiramente realizadas em países de alta prevalência de TB-MDR (Bottger & Springer, 2008; Miotto et al., 2018; Dookie et al., 2018).

A OMS propôs uma nova definição, o 'ponto de interrupção clínico' (CB). O CB reflete a concentração superior que deve ser testada para definir quais isolados ainda podem responder à terapia quando uma dosagem mais alta do fármaco for usada. O CB não tem valor para vigilância, mas é importante para o acompanhamento do tratamento individualizado. Uma CB foi recentemente definida para moxifloxacina (MFX) conforme descrito no relatório técnico atualizado sobre CC para TS que poderá ser estabelecido para outros fármacos no futuro. (WHO 2018).

**Tabela 2:** Fármacos usados para tratamento da TB de acordo com as classes e mutações genéticas mais comuns que conferem resistência

Fármaco	Classe química	Genes do MTB que conferem as mutações mais comuns	Testes aprovados OMS	Testes pela OMS
<b>Fármacos orais de 1ª linha</b>				
Isoniazida	Piridina	<i>katG, inhA</i>	MTBDRplus (v1,0 e v2,0 e Nipro NTM +MDRTB)	

Etambutol	Etilenodiamina	<i>embB, ubiA</i>	<i>embB</i> em MTBDRsl v1.0
Rifampicina	Rifamicina	<i>rpoB</i>	GeneXpert TB/RIF, MTBDR <i>plus</i> (v1.0 e v2.0) Nipro NTM +MDRTB
<b>Grupo A: fluorquinolonas</b>			
Levofloxacina	Fluorquinolonas	<i>gyrA, gyrB</i>	<i>gyrA</i> MTBDRsl (v1,0 e v2,0) <i>gyrB</i> v2,0 somente
Moxifloxacina	Fluorquinolonas	<i>gyrA, gyrB</i>	
Gatifloxacina	Fluorquinolonas	<i>gyrA, gyrB</i>	
<b>Grupo B: segunda linha injetáveis</b>			
Canamicina	Aminoglicosídeos	<i>rrs, eis</i>	<i>rrs</i> MTBDRsl (v1.0 e v2.0) <i>eis</i> em v2.0 somente
Amicacina	Aminoglicosídeos	<i>rrs, eis</i>	<i>rrs</i> MTBDRsl (v1.0 e v2.0) <i>eis</i> em v2.0 somente
Capreomicina	Aminoglicosídeos	<i>rrs, tylA</i>	<i>rrs</i> MTBDRsl (v1.0 e v2.0)
Estreptomicina	Aminoglicosídeos	<i>rpsL, rrs, gidB</i>	<i>rrs</i> MTBDRsl (v1.0 e v2.0)
<b>Grupo C: outros fármacos de segunda linha</b>			
Clofazimine	Riminofenazime	<i>Rv0678</i>	Não aprovado
Linezolida	Oxazolidona	<i>rrl, rplC</i>	Não aprovado
<b>Grupo D e fármacos mais novos</b>	-----	-----	<b>Não aprovado</b>

Koch A et al; 2018.

## 2.8 Métodos genotípicos e fenotípicos recomendados pela OMS para detecção de TB e TB-DR

Dada a alta prevalência da TB em várias regiões do mundo, o aumento da TB-DR e as dificuldades de diagnóstico laboratorial em um grande número de países, em outubro de 2019, a OMS divulgou um relatório de consulta com especialista técnicos



sobre a acurácia de ensaios centralizados para a detecção de CMTB e resistência a RIF e INH (WHO 2020c).

O grupo avaliou quatro metodologias de TB centralizados de alto rendimento: Abbott RealTime MTB e ensaios MTB RIF / INH, ensaios Roche Cobas® MTB e MTB-RIF / INH, ensaio Hain FluoroType® MTBDR e BD MAX™ Ensaio MDR-TB. Após avaliação de estudos para determinar a sensibilidade analítica para CMTB e resistência a RIF e INH, cada um dos quatro ensaios exibiu desempenho semelhante aos ensaios já recomendados pela OMS para a detecção de TB (Cepheid GeneXpert®MTB / RIF) e resistência a RIF e INH (Genotype®MTBDRplus).

A consulta de especialistas técnicos concluiu que estudos adicionais seriam necessários para validar o desempenho dos ensaios com amostras clínicas sob condições de teste de rotina antes da aprovação pela OMS.

Em março de 2020, o *Expert Review Panel Diagnostic* (ERPD), grupo de especialistas para revisão de novos testes diagnóstico do Fundo Global de Combate à AIDS, Tuberculose e Malária (Fundo Global) aprovou Abbott RealTime MTB e MTB RIF / INH e o ensaio BD MAX TB-MDR para a detecção de TB e resistência a RIF e INH.

A aprovação pelo ERPD permite que países que dependem de recursos usem o financiamento do Fundo Global para adquirir produtos por um período de tempo limitado, com possibilidade de renovação (para os ensaios Abbott e BD, até março de 2021). Essas aprovações foram provisórias com potencial recomendação pela OMS.

As novas recomendações da OMS visam o fortalecimento dos laboratórios sob a Estratégia do Fim da TB para que os programas nacionais de TB devam priorizar o desenvolvimento de uma rede de laboratórios que usem métodos modernos de diagnóstico, métodos genotípicos e cultura automatizada em meio líquido, ter sistemas de referência eficientes, usar dados eletrônicos e conectividade de diagnóstico, usar procedimentos operacionais padrão (POPs) e processos de garantia de qualidade (CQ) adequados, cumprir princípios de biossegurança para todos os testes e ter recursos humanos suficientes. Essas prioridades devem ser

abordadas de forma abrangente nos planos estratégicos nacionais e devem ser adequadamente financiados (WHO 2020c).

A base de evidências para itens não comerciais selecionados métodos de cultura e DST foi revisado pela OMS, e o desempenho destes métodos foram considerados aceitáveis em laboratórios de referência ou nacionais em selecionados configurações apenas quando protocolos de laboratório rigorosos

- ✓ **Ensaio de sonda em linha (LPAs; GenoType® MTBDRplus e GenoType® MTBDRsl, HAIN Lifescience, Nehren, Alemanha; Kit de detecção NTM + MDRTB, NIPRO Corporation, Osaka, Japão).**

Em 2008, a OMS aprovou a utilização do LPA de primeira linha - GenoType®MTBDRplus (Hain Lifescience Nehren, Alemanha) para a detecção rápida da TB-MDR. Os Hain LPAs vêm em duas versões: uma para resistência a fármacos de primeira linha (RIF e INH) e outra para FQ e fármacos injetáveis de segunda linha. Uma nova versão, o ensaio Genotype®MTBDRplus v2 pesquisa mutações específicas na região determinante de resistência à RIF (TB-RR) no gene *rpoB* (do códon 505 ao 533) e mutações na região promotora do gene *inhA* e na região do *katG* (códon 315) para identificar a resistência à INH de baixo e alto nível respectivamente (WHO 2016; Gardee et al., 2017).

Em 2015 a OMS recomendou uma nova versão de LPA do GenoType®MTBDRsl para a detecção de resistência a fármacos de segunda linha. Neste foi incluído a região determinante de resistência das FQ os genes *gyrA* (do códon 85 a 96) e *gyrB* (do códon 536 ao 541), e das regiões promotoras dos genes *rrs* (posição do ácido nucleico 1401, 1402 e 1484) e *eis*, para a detecção de resistência à fármacos injetáveis de segunda linha AMI (WHO 2016; Koch et al., 2018).

A complexidade dos testes limita o uso desta tecnologia ao nível de laboratório de referência central ou laboratórios de nível regional onde a infraestrutura deve ser apropriada para que os procedimentos técnicos possam ser assegurados, já que devem ser realizados sob condições ideais e em laboratórios com nível de biosegurança 3-NB3 (Gilpin et al., 2016; Brandão et al., 2019).

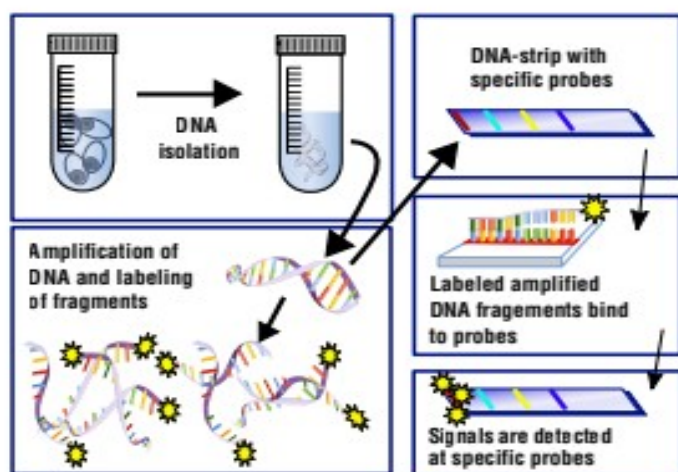
No novo documento de 2020, a OMS recomenda que esse teste deve ser usado para pacientes com TB-MDR / RR confirmada. Estas recomendações se aplicam

para testar amostras de escarro, independentemente do resultado do esfregaço e isolados de cultura de CMTB de ambos os sítios, pulmonar e extrapulmonar.

O TS fenotípico baseado em cultura pode ser útil na avaliação de pacientes com resultados negativos, particularmente em populações com alta probabilidade pré-teste de resistência às FQ e aos aminoglicosídeos, são úteis também para detectar a resistência FQ antes de iniciar a terapia para TB-Hr.

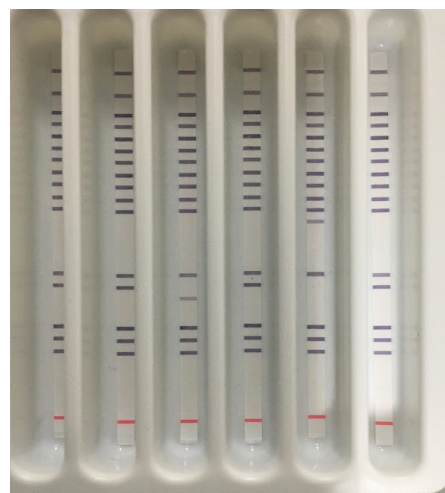
Na revisão de novos métodos em 2019 a OMS incluiu o Kit de detecção NTM + MDRTB (NIPRO Corporation, Osaka, Japão), que permite a detecção de resistência a RIF, INH e ETH.

**Figura 13:** Esquema de procedimentos do ensaio de sonda em linha - LPA. revelada



OMS 2020.

**Figura 14:** Fita Genotype revelada



Acervo do autor, 2019.

2.9 Métodos em revisão pela OMS com perspectivas futuras de recomendação para uso no diagnóstico da TB

O ensaio LPA Genoscholar® PZA-TB II (Nipro, Osaka, Japão), é o único ensaio disponível comercialmente para a detecção de mutações no gene *pncA* que são relacionados à resistência à PZA.

O sequenciamento de DNA usando métodos de sequenciamento de última geração (NGS) também pode detectar mutações rapidamente associado à resistência a medicamentos para vários fármacos anti-TB. TS baseados em NGS tem potencial para reduzir a necessidade de TS fenotípico para decisões de atendimento ao paciente e pesquisas de resistência a medicamentos. O TS baseado em NGS pode ser particularmente útil para fármacos para os quais o teste fenotípico não é confiável. Os sistemas NGS atuais têm limitações, em particular, com a experiência e os recursos computacionais necessários. Assim, a implementação de NGS provavelmente deve-se concentrar na capacitação do laboratório nacional de referência de TB e, talvez, em laboratórios regionais de referência de TB com bom desempenho. Os ensaios NGS para detectar DR-TB diretamente de amostras clínicas respiratórias estão em desenvolvimento.

O Next Gen RDST (Translational Genomics Research Institute, Phoenix, Arizona, EUA) pode detectar mutações associadas à resistência a pelo menos sete fármacos, e o Deeplex®-MycTB (GenoScreen, Lille, França) pode detectar mutações em regiões gênicas associadas à resistência a pelo menos 13 fármacos. Esses métodos ainda não foram revisados ou aprovados pela OMS (WHO 2020c).

O NGS e a análise de todo o genoma pode eventualmente se tornar o padrão referência para identificação de resistência aos fármacos. Redução de custos e o estabelecimento de centros de sequenciamento de alto rendimento e ferramentas analíticas fáceis de usar aumentariam o acesso ao NGS, que está sendo implementado como rotina serviço em vários países ( Miotto et al., 2018; Spitaleri et al., 2019; WHO 2020c).

### **3 JUSTIFICATIVA**

O programa da OMS *The End TB Strategy* recomenda o acesso universal aos TS, porém essa realidade não é disponível ou é subutilizada pelas dificuldades inerentes à implantação em países com poucos recursos (Gilpin et al., 2016; WHO 2014).

As metas para o controle da TB como as do programa da OMS STOP TB só serão alcançadas se a cobertura dos diagnósticos laboratoriais for ampliada para garantir urgentemente um diagnóstico rápido, correto e oportuno. Portanto, deve-se aumentar a capacidade dos laboratórios em realizar a detecção do *M. tuberculosis* e o TS com garantia de qualidade, bem como desenvolver, avaliar e implantar novos testes diagnósticos mais rápidos.

Dentro dessa demanda por testes diagnósticos laboratoriais rápidos, com acurácia e com baixos custos a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) é fundamental para avaliar ou ajustar o esquema terapêutico (Miotto et al., 2018; Schön et al., 2020). O seu conhecimento é particularmente importante quando seu valor encontra próximos ao da concentração crítica (CC), isto é, baixo nível de resistência, indicando que o fármaco ainda pode ser administrado com o aumento da dose, quando aplicável, principalmente para RIF e INH e para alguns fármacos de segunda linha (AMI, CAP, OFX, MOX), por outro lado, o relato de um resultado com alto nível de resistência implica que o fármaco não deve ser administrado.

Assim, evitaria uma mudança desnecessária de esquemas terapêuticos padronizados e como consequência a seleção de mutantes resistentes, além de garantir uma efetividade maior do tratamento com a manutenção do uso de fármacos de primeira linha quando possível (Miotto et al., 2017; Fowler et al., 2017; Miotto et al., 2018; Dookie et al., 2018; Kaniga et al., 2018; WHO 2020b).

A utilização dos ensaios de sonda em linha, Genotype<sup>®</sup>MTBDR*plus* v2 que detectam em horas o *M. tuberculosis* e os genes de resistência associados à RIF e INH, fármacos mais importantes e eficazes para o tratamento da TB agregam vários benefícios para o controle da TB principalmente no que refere ao tratamento e à melhor condução do paciente no sistema de saúde. Incluem um melhor prognóstico, aumento da sobrevida, prevenção da aquisição de resistência e redução da disseminação de isolados resistentes nas populações vulneráveis. (OMS 2020b). Estudos que avaliaram a sensibilidade e especificidade à RIF foi de 96,7% e 98,8%

e de 90,2% e 99,2% para INH respectivamente quando realizado em isolados clínicos. (OMS 2020c).

O sistema Gene Xpert® MTB / RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA) é o único teste de diagnóstico recomendado pela OMS que pode detectar simultaneamente o *M. tuberculosis* e a resistência à RIF, e adequado para uso em todos os níveis do sistema de saúde.

O GeneXpert MTB / RIF Ultra, é a versão que possui alta sensibilidade na detecção de resistência da TB e da resistência à RIF, é teste em PCR em tempo real totalmente automatizado para a detecção de DNA do *M. tuberculosis* e mutações associadas à resistência RIF, diretamente de amostras clínicas. Para a detecção de resistência à RIF, a sensibilidade e especificidade combinadas foram 95% e 98%, respectivamente. Além disso, o ensaio Xpert MTB / RIF pode identificar rapidamente possíveis casos de TB-MDR. A resistência a R é um preditor de TB MDR porque na maioria dos casos, coexiste com resistência a H com consequente impacto para adequar um tratamento personalizado com fármacos de segunda linha (OMS 2011b).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os perfis de sensibilidade de isolados clínicos de hospital de alta complexidade e de referência terciária frente aos fármacos de primeira e segunda linha por métodos fenotípicos e genotípicos.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas pelo método de microtitulação com rezasurina, REMA (*Resazurin Microtitre Assay*) de isolados resistentes e sensíveis frente aos fármacos de primeira e segunda linha.

2 - Comparar os resultados dos testes de sensibilidade à RIF e INH pelo método de microtitulação com rezasurina (REMA) com BACTEC™ Mycobacterial Growth Indicator Tube™ 960 (MGIT), GeneXpert MTB/RIF® e Genotype MTBDR*plus* (v2).

## 5 MATERIAIS E METODOLOGIA

Os isolados clínicos foram provenientes do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG), hospital de alta complexidade da cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais e do Hospital Júlia Kubitschek (HJK), hospital geral e de referência terciária da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais – FHEMIG.

O estudo foi realizado com isolados positivos da rotina e com isolados estocadas a -80°C no banco do Laboratório de Pesquisa em Micobacterias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (LPM/FM/UFMG).

O total de isolados clínicos utilizados no estudo foi de 49, sendo 43 provenientes do HJK e seis do HC/UFMG. A média de resistência no período de coleta dos isolados foi de 6,75 por ano no período de janeiro de 2017 a março de 2020.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG, sob o número de protocolo CAAE: 95206318.3.0000.5149.

Critérios de inclusão: Cultura do *M. tuberculosis*

Critérios de exclusão: isolados sem resultados do teste de sensibilidade pelo MGIT, ou pelo GeneXpert®MTB/RIF ou pelo GenoType®MTBDRplus, culturas contaminadas.

### MIC REMA

O protocolo utilizado foi o “*Procedure Manual*”, do *Institute of Tropical Medicine*, 2009 com adaptações, Palomino et al., 2002.

#### A) Preparo do meio Middlebrook 7H9.

Pesou-se 0,94 g do pó 7H9 e dissolveu-se em 180 ml de água destilada até completa solubilização que foi suplementado por: 0,1 % de casitone, 0,5 % de glicerol e 10% de OADC.



### **B) Preparo do inóculo bacteriano.**

A partir de um isolado do *M. tuberculosis* com crescimento em meio LJ, colônias foram transferidas com alça bacteriológica descartável estéril e para um tubo estéril contendo 3,0 ml de 7H9/OADC. O meio foi incubado a 37 °C por sete dias, após este período a suspensão foi homogeneizada e ajustada na turvação da escala McFarland nº 1 - suspensão padrão.

A suspensão bacteriana de uso foi preparada uma diluição de 1:10 a partir da suspensão padrão em meio 7H9/OADC.

### **C) Preparo das soluções dos fármacos.**

Os cálculos realizados para a pesagem foram corrigidos pela potência de cada fármaco. Após, foram preparadas soluções estoque (sol nº 1) e a partir dessas soluções de uso 4x maior que a concentração mais alta cada fármaco (sol. de uso nº 2) foram preparadas para ser utilizada no ensaio.

As faixas de diluições das concentrações dos fármacos utilizadas foram as seguintes:

- ✓ Rifampicina, levofloxacina, moxifloxacina, amicacina e capreomicina: 64 a 0,125 µg/mL.
- ✓ Isoniazida e rifabutina: 32 a 0,060 µg/mL.
- ✓ Linezolida: 8 a 0,015 µg/mL.

A cepa H37Rv *American Type Culture Collection* (ATCC 27294) foi utilizada como controle de crescimento sensível.

E as cepas resistentes à R cepa ATCC 35837 e à H cepa ATCC 35838 como controle de mudança de cor do corante e concentração dos fármacos.

### **D) Preparação dos testes em microplacas estéreis com 96 orifícios e fundo em U com tampa.**

- ✓ Adicionou-se 100 µL do meio 7H9/OADC em todos os orifícios, com exceção dos orifícios externos em que foi adicionado 200 µL de água destilada estéril

para evitar a evaporação durante a incubação.

- ✓ Após, adicionou-se 100  $\mu$ L da solução do fármaco a partir da maior concentração nos orifícios da primeira linha, com subseqüentes diluições em série de 2 vezes foram realizadas.
- ✓ As diluições seriadas foram realizadas na própria placa com auxílio de pipeta multicanal, passando 100  $\mu$ L do primeiro orifício para o outro até o último relativo à menor concentração, obtendo desta forma as diluições sequenciais (1:2), no último orifício os 100  $\mu$ L finais foram descartados.
- ✓ Testamos os fármacos com uma ampla faixa de diluições dos fármacos para determinar corretamente e com robustez os MICs.
- ✓ Após adicionou-se 100  $\mu$ L da suspensão bacteriana diluída a 1:10 em todos os orifícios.
- ✓ Em cada placa foi utilizado controle sem fármaco usado como controle de crescimento e outro sem suspensão bacteriana como controle de esterilidade do teste.
- ✓ Para cada rodada de testes a cepa H37Rv foi utilizada como controle e as cepas ATTC resistentes à R e H.
- ✓ Após, foram fechadas e incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 7 dias.

**Figura 15:** Diagrama representativo preparação da microplaca para diluição de soluções de fármacos.

200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O
CC	0,125µg/mL	0,25µg/mL	0,5µg/mL	1µg/mL	2µg/mL	4µg/mL	8µg/mL	16µg/mL	32µg/mL	64 µg/mL	200µL H <sub>2</sub> O	
CE	C10	C9	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	200µL H <sub>2</sub> O	
CC	0,06µg/mL	0,125µg/mL	0,25µg/mL	0,5µg/mL	1µg/mL	2µg/mL	4µg/mL	8µg/mL	16µg/mL	32µg/mL	200µL H <sub>2</sub> O	
CE	C10	C9	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	200µL H <sub>2</sub> O	
CC	0,015µg/mL	0,03µg/mL	0,06µg/mL	0,125µg/mL	0,25µg/mL	0,5µg/mL	1µg/mL	2µg/mL	4µg/mL	8µg/mL	200µL H <sub>2</sub> O	
CE	C10	C9	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	200µL H <sub>2</sub> O	
200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O	200µL H <sub>2</sub> O

C1 a C10: distribuição da maior concentração para menor concentração, diluição seriada e em duplicada para cada fármaco/isolado clínico. Estão representadas as três diluições usadas de acordo com os fármacos: 64 a 0,125 µg/mL; 32 a 0,06 µg/mL e 8,0 a 0,015 µg/mL.

CC: controle de crescimento com suspensão bacteriana sem fármaco.

CE: controle esterilidade, 200 µL de meio 7H9 OADC.H<sub>2</sub>O: água destilada estéril.

### **E) Leitura e interpretação**

Após sete dias de incubação, 30µL de solução aquosa de resazurina a 0,02% foram adicionados aos poços dos controles de crescimento. As placas foram incubadas por mais 24 – 48 horas.

Após avaliação dos poços controle, a solução do corante era adicionada aos poços com os fármacos.

O resultado era considerado resistente quando havia mudança de cor de azul para rosa, que indicava crescimento bacteriano.

O MIC foi determinado no poço da menor concentração do fármaco que impedia o crescimento bacteriano, isto é, na última diluição onde não havia mudança de cor. O valor do MIC era a concentração correspondente.

Todos os testes foram realizados em duplicata e a leitura dos resultados foram avaliados por dois observadores.

Os pontos de corte utilizados para os fármacos para determinação dos MIC (Método REMA) encontram-se na tabela 1.

**Tabela 3:** Consenso atual para as concentrações críticas dos fármacos de primeira e segunda linha pelos métodos de sensibilidade indicados

Fármacos	Métodos avaliados de TS	Concentração Crítica TS	
		Middlebrook 7H10	MGIT960
Isoniazida	sólido, líquido	0,2	0,1
Isoniazida ( <i>high</i> )	sólido, líquido	1,0	0,4
Rifampicina	sólido, líquido	1,0	1,0
Rifabutina	sólido, líquido	0,5	0,5
Ethambutol	sólido, líquido	5,0	5,0
Estreptomicina	sólido, líquido	2,0	1,0
Canamicina	sólido, líquido	5,0	2,5
Amikacina	sólido, líquido	4,0	1,0
Capreomicina	sólido, líquido	10,0	2,5
Levofloxacina	sólido, líquido	1,0	1,5
Moxifloxacina	sólido, líquido	0,5	0,25
Moxifloxacina( <i>high</i> )	líquido	–	2,0
Clofazimine *	líquido	1,0	–
Linezolida	líquido	–	1,0

A Clinician's Guide to the TB. Laboratory. Heartland National TB Center (36).  
DST: *Drug Susceptibility Testing*; High: alta concentração. \* Gopal M *et al.* Int J Tuberc Lung Dis, 2013 (37).

Na tabela abaixo encontram-se os pontos de corte dos fármacos de primeira e segunda linha utilizados no estudo.

**Tabela 4:** Concentrações críticas dos fármacos utilizados no estudo para MIC-REMA.

Concentração dos principais fármacos de primeira e segunda linhas								
Fármacos	Rifampicina	Rifabutina	Isoniazida	Amicacina	Capreomicina	Levofloxacina	Moxifloxacina	Linezolida
Concentração crítica µg/mL	1	0,5	0,25	1	2,5	1	0,25	1

Kaniga et al., 2018; *Clinician's Guide to the TB. Laboratory. Heartland National TB Center* 2019; OMS 2021b.

#### Definições dos termos sensível e resistente.

**S - Sensível, dose padrão:** um microrganismo é categorizado como sensível, dosagem padrão, quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico utilizando o regime de dosagem padrão do fármaco.

**R - Resistente:** um microrganismo é categorizado como resistente quando há alta probabilidade de falha terapêutica mesmo quando há aumento da exposição.

Exposição depende do modo da via de administração, da dose, do intervalo entre as doses, do tempo de infusão assim com a distribuição, o metabolismo e a excreção do antimicrobiano. (EUCAST, 2020).

## Resultados de MIC REMA

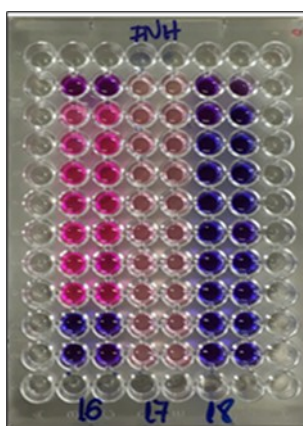
**Figura 16:** MIC-REMA de rifampicina



Isolados 7 e 8 (MIC  $\leq$  0,125  $\mu\text{g/mL}$ ) - sensível

Isolado 9 (MIC  $\geq$  64  $\mu\text{g/mL}$ ) – resistente

**Figura 17:** MIC-REMA de isoniazida



Isolado 16 para Isoniazida (MIC = 8,0  $\mu\text{g/mL}$ ) – resistente

Isolado 17 para Isoniazida sem leitura

Isolado 18 para Isoniazida (MIC < 0,060  $\mu\text{g/mL}$ ) - sensível

✓ **MGIT-960 kit SIRE (BACTEC™ Mycobacterial Growth Indicator Tube™ 960).**

O método MGIT-960 kit SIRE foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações do kit SIRE são: S a 1,0 g / mL, INH a 0,1 g / mL, RIF a 1,0 g / mL, e E a 5,0 g / mL. Resumidamente, um inóculo padrão é preparado a partir de cultura positiva de meio sólido. O suplemento do kit SIRE (0,8 mL) foi adicionado a cada tubo MGIT de 7 ml, seguido por 0,1 mL da solução do fármaco e 0,5 mL do inóculo de teste. Para cada isolado, um tubo controle de crescimento com suplemento SIRE sem fármaco foi incluído. A proporção de crescimento relativo entre os tubos contendo fármacos e o tubo de controle de crescimento livre de fármaco foi determinado pelo sistema algoritmo do software e resultados foram relatados automaticamente.

Os TS pelo MGIT 960 *kit* SIRE foram realizados no laboratório Fundação Ezequiel Dias (FUNED), no laboratório do Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas do Instituto Octávio Magalhães (IOM/Funed) que é referência para o diagnóstico da infecção em Minas Gerais, sendo o único laboratório no estado que realiza a identificação do *M. tuberculosis* e o TS aos fármacos recomendados pelo Ministério da Saúde (MS) para tratamento da doença.

✓ **Ensaio GeneXpert®MTB/RIF.**

Os testes foram realizadas nos laboratórios de Microbiologia do HJK e no laboratório de Micobactérias da FM/HC-UFMG.

Esse teste é recomendado para uso em amostras é realizado em amostras do trato respiratório (escarro, aspirado traqueal e lavado bronco-alveolar). Resumidamente, 2 ml de reagente do kit foram adicionados a um tubo Falcon de 15 mL contendo 1 mL da amostra clínica não processada e não descontaminada na proporção de 2:1. Após agitação do tubo por duas vezes durante a incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, 2 mL de amostra liquefeita é transferida para um cartucho GeneXpert®MTB/RIF e carregada em um módulo do equipamento.



Os resultados são liberados de acordo com protocolos pré-estabelecidos com relatos de detecção ou não do *M. tuberculosis* e do gene *rpoB*.

✓ **Ensaio GenoType® MTBDRplus**

Os testes foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Saúde Pública da Faculdade de Farmácia da UFMG.

As amostras dos isolados clínicos foram processadas de acordo com as instruções do fabricante para extração, amplificação e hibridização do DNA. O ensaio tem controles embutidos nos quais um resultado é válido e indicado pelo aparecimento de 5 zonas de controle em cada faixa: uma zona de controle de conjugado (CC), uma zona de controle de amplificação (CA) e três zonas de controle de *locus* (*rpoB* para R e *katG* e *inhA* para INH).

**NOTA EXPLICATIVA**

Segundo o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Minas Gerais, os resultados e discussões serão apresentados em formato de artigo. Como pré-requisito para a defesa da tese de doutorado, esta deve conter pelo menos um artigo submetido em revista indexada pelo *Journal Citation Reports* (JCR) e classificada no WebQualis Periódicos da área Medicina I para prosseguimento na obtenção do título de Doutor em Saúde do Adulto.

O Artigo foi submetido na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Qualis B2.

Abaixo está inserido a versão em português e em inglês do artigo enviado.

## ARTIGO

### Título

Comparação da Concentração Inibitória Mínima do Mycobacterium tuberculosis por REMA com MGIT-960® Kit SIRE, GenoType®MTBDRplus e GeneXpert®MTB/RIF.

### Resumo

**Introdução:** O diagnóstico rápido de Mycobacterium tuberculosis resistente aos fármacos é um desafio em países de baixa renda. Os métodos indicadores de oxidação colorimétricos como Resazurin Microtitre Assay (REMA) são relativamente novos e indicados pela Organização Mundial da Saúde como testes para determinar a sensibilidade aos fármacos antituberculose.

**Objetivos:** Comparar o resultado da Concentração Inibitória Mínima (MIC) do Mycobacterium tuberculosis por REMA com MGIT-960 kit SIRE (BD BACTECTM MGITTM 960 System), GenoType®MTBDRplus e GeneXpert®MTB/RIF.

**Métodos:** Foram incluídos 27 isolados clínicos de M. tuberculosis (14 sensíveis e 13 resistentes) pelo método MGIT-960 kit SIRE. O MIC foi realizado pelo método REMA (MIC-REMA), e os testes genotípicos por GenoType®MTBDRplus e GeneXpert®MTB/RIF. Para a análise de comparação entre os métodos foi utilizado o teste exato de Fisher's.

**Resultados:** A concordância entre os resultados do MIC-REMA com o MGIT-960 kit SIRE e o GenoType®MTBDRplus para rifampicina (RIF) e isoniazida (INH) teve kappa < 0,001 assim como a concordância do MIC-REMA com os resultados de RIF do GeneXpert®MTB/RIF o que demonstra alto grau de concordância.

**Discussão:** no presente estudo MIC-REMA apresentou boa concordância quando comparado com o MGIT 960 kit SIRE, o GenoType®MTBDRplus e GeneXpert®MTB/RIF com kappa < 0,001. Não encontramos estudos com avaliações que utilizaram os mesmos métodos para uma melhor correlação dos resultados em um estudo similar. Entretanto, ao avaliar os resultados desses estudos que utilizaram os métodos aqui descritos observamos que foram semelhantes na concordância.

**Conclusão:** O MIC-REMA mostrou ser altamente concordante com os testes fenotípicos e genotípicos para RIF e INH.

**Palavras-chave:** M. tuberculosis; resazurin assay; tuberculose multidroga resistente; Testes de Sensibilidade Microbiana.

## **Introdução**

A taxa de incidência da tuberculose (TB) em 2019 no mundo foi de aproximadamente 10 milhões de casos novos com 1,2 milhões de morte por ano. Houve aumento de 10% de TB-MDR (TB multidroga resistente) em comparação ao ano de 2018. (1).

No Brasil no mesmo período, foram diagnosticados 73.864 casos novos de TB o que correspondeu ao coeficiente de incidência de 35,0 casos/100 mil habitantes. Em 2020, foram diagnosticados no Brasil, 913 casos de TB-DR (TB droga resistente) (2).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que devem ser realizados testes de sensibilidade (TS) aos fármacos anti-TB para todos os pacientes diagnosticados com TB. Os métodos Colorimetric Redox Indicator (CRI) são métodos indiretos baseados na reação de redução de um indicador de oxi-redução adicionado ao meio de cultura líquido em uma microplaca de titulação que após exposição a isolados clínicos do M. tuberculosis detecta o crescimento frente à diferentes concentrações de fármacos (3).

O Método Resazurin Microtitre Assay (REMA) é recomendado pela OMS como teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e pode ser usado em locais em que os métodos genotípicos ou automatizados não estão disponíveis (4).

O MGIT-960 kit SIRE é um sistema automatizado com alto desempenho para isolamento primário e teste de sensibilidade aos fármacos de primeira linha anti-TB: estreptomicina (S), isoniazida (INH), rifampicina (RIF) e etambutol (E). Recentemente, foi desenvolvido um Software EpiCenter, versão 5.53, equipado com módulo TB eXiST, que faz registros automatizados de leituras, controla o tempo de incubação, faz representação gráfica dos valores de UC (unidades de crescimento) o que permite estabelecer um TS quantitativo do M. tuberculosis. Porém, tem como desvantagens seu elevado custo, necessidade de sistemas informatizados, de

estruturas laboratoriais complexas e de equipe profissional altamente especializada (3, 5).

O GeneXpert®MTB/RIF é indicado pela OMS para substituir à baciloscopia uma vez que é uma tecnologia de fácil implantação e execução. Fornece resultado acurado e rápido, pode ser utilizado em laboratórios pouco especializados, possui alta sensibilidade e especificidade para a detecção simultânea do M. tuberculosis e da mutação rpoB associada à resistência a rifampicina (RIF). No Brasil, apenas alguns municípios dispõem desse equipamento, e mesmo subsidiado há dependência da variação do dólar e apresenta alto custo de manutenção. (6,7).

O ensaio de sonda em linha GenoType®MTBDRplus detecta genes de resistência para RIF (rpoB) e isoniazida (INH) (inhA e katG), essa metodologia é tecnicamente mais complexa, e por se tratar de método genotípico não oferece resultados quantitativos para a avaliação do nível de resistência. (8).

O objetivo deste trabalho foi comparar o resultado da Concentração Inibitória Mínima (MIC) do M. tuberculosis pelo método REMA com o MGIT-960 kit SIRE, GenoType®MTBDRplus e GeneXpert®MTB/RIF.

#### Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG, sob o número de protocolo CAAE: 95206318.3.0000.5149.

#### **Materiais e Métodos**

O presente estudo utilizou isolados clínicos do M. tuberculosis provenientes de pacientes do Hospital Júlia Kubitscheck (HJK), Centro de Referência Terciário e do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG), hospital de Alta Complexidade.

Foram incluídos neste estudo o total de 27 isolados clínicos (14 sensíveis e 13 resistentes).

Os testes de sensibilidade MGIT-960 kit SIRE foram realizados no Laboratório de Micobactérias da Fundação Ezequiel Dias, Laboratório de Referência Estadual. (9).

#### Método MIC REMA

As faixas de concentrações dos fármacos utilizadas foram: RIF de 64 µg/mL a 0,125 µg/mL e para INH de 32 µg/mL a 0,060 µg/mL.

Os testes do REMA foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Micobactérias da Faculdade de Medicina/UFMG. As suspensões bacterianas foram preparadas transferindo as colônias cultivadas em meio Löwenstein-Jensen (LJ) para o meio líquido 7H9 Middlebrook suplementado com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) e comparadas com o padrão McFarland 1, e posteriormente diluídas a 1:10 para serem distribuídas em microplacas de 96 poços, estéreis com tampa (4,10). A cepa ATCC 27294, H37Rv sensível e as cepas ATCC 35837 resistente a RIF e ATCC 35838 resistente a INH foram utilizadas como controles interno para a leitura do MIC-REMA.

Foram distribuídos 100 µL de 7H9 + OADC nos poços das microplacas. Posteriormente foram distribuídos com pipetas multicanal 100 µL dos fármacos citados acima e realizadas as diluições seriadas. Por fim, 100 µL de suspensão bacteriana 1:10 foram transferidos em todos os poços com exceção dos poços periféricos que foram preenchidos com 200 µL de água estéril. Para cada isolado foram preparados testes em duplicata e incubadas a 37°C por sete dias após, foram adicionados 30 µL de solução de resazurina a 0,02% nos poços com fármacos e nos poços com controle crescimento. As microplacas foram incubadas por 24h e avaliados a mudança de cor, e se não houvesse mudança da cor, passaram a ser incubadas por mais 24h para leitura final.

A leitura foi realizada pela observação visual de mudança de cor de azul para rosa, que indica crescimento bacteriano. Assim, o MIC foi definido como a menor concentração do fármaco que evitou a mudança de cor, isto é, onde houve inibição de crescimento do *M. tuberculosis* pelo fármaco. Os resultados foram avaliados por dois observadores independentes, se houvesse discordância outro observador era consultado para fazer o discernimento do resultado. Os pontos de corte para categorizar isolados resistentes de sensíveis foram: RIF  $\leq 1,0$  µg/mL e INH  $\leq 0,25$  µg/mL. (10 11).

Foi considerado MIC da RIF como nível alto de resistência  $>20$  µg/mL, nível moderado MIC  $> 4$  µg/mL e  $\leq 20$  µg/mL e nível baixo  $>1,0$  µg/mL e  $\leq 4,0$  µg/mL.

Para INH nível baixo  $> 0,25 \mu\text{g/mL}$  e  $\leq 1,0 \mu\text{g/mL}$ , moderado  $> 1,0$  e  $\leq 10 \mu\text{g/mL}$  e alto  $> 10 \mu\text{g/mL}$ . (12).

Método GenoType® MTBDRplus e GeneXpert®MTB/RIF

O Método GenoType®MTBDRplus foi utilizado para detectar mutações nos genes *rpoB*, *katG* e a região promotora *inhA* de isolados clínicos, e o GeneXpert®MTB/RIF para a detecção do Complexo M. tuberculosis e a mutação do *rpoB*, diretamente de amostras clínicas. Esses testes seguiram as recomendações do fabricante. (6,8).

Para análise dos resultados foi utilizado o software Stata versão 15 (StataCorp, College Station, TX, USA) (e o teste exato de Fisher's para avaliar a concordância entre os resultados obtidos de RIF e INH).

## Resultados

Comparação dos resultados do MIC-REMA (RIF e INH) e MGIT-960 kit SIRE

O número de isolados sensíveis pelo MGIT-960 kit SIRE para RIF foram 14/27 e os do MIC-REMA 15/27 (um isolado com MIC  $> 64 \mu\text{g/mL}$ ). Em relação aos resistentes pelo MGIT-960 kit SIRE foram 13/27 e os do MIC-REMA 12/27 (um isolado com MIC =  $0,250 \mu\text{g/mL}$ ).

O número de isolados sensíveis pelo MGIT-960 kit SIRE para INH foram 13/27 e os do MIC-REMA 11/27 (dois isolados com MIC =  $1,0 \mu\text{g/mL}$ ). Em relação aos resistentes pelo MGIT-960 kit SIRE foram 16/27 e os do MIC-REMA 14/27 (um isolado com MIC  $< 0,060 \mu\text{g/mL}$  e um MIC =  $0,060 \mu\text{g/mL}$ ).

O número de resultados MDR pelo MGIT-960 kit SIRE foram 13/27 e os do MIC-REMA 12/27 (um isolado RIF =  $0,125 \mu\text{g/mL}$  e INH com MIC =  $0,060 \mu\text{g/mL}$ ).

Comparação dos resultados do MIC-REMA (RIF e INH) e GenoType®MTBDRplus

O número de isolados sensíveis pelo GenoType®MTBDRplus para RIF foram 14/27 e os do MIC-REMA 13/27 (um isolado com MIC  $> 64 \mu\text{g/mL}$ ). Em relação aos resistentes pelo GenoType®MTBDRplus foram 13/27 e os do MIC-REMA 14/27 (um isolado com MIC  $< 0,125 \mu\text{g/mL}$ ).

O número de isolados sensíveis pelo GenoType®MTBDRplus para INH foram 12/27 e os do MIC-REMA 13/27 (um isolado com MIC = 1,0 µg/mL). Em relação aos resistentes pelo GenoType®MTBDRplus foram 15/27 e os do MIC-REMA 14/27 (um isolado com MIC < 0,060 µg/mL).

O número de resultados MDR pelo GenoType®MTBDRplus foram 13/27 e os do MIC-REMA 12/27 (um isolado RIF = 0,125 µg/mL e INH com MIC = 0,060 µg/mL).

Comparação dos resultados do MIC-REMA (RIF) e GeneXpert®MTB/RIF

O número de isolados sensíveis pelo GeneXpert®MTB/RIF para RIF foram 14/27 e os do MIC-REMA 15/27 (um isolado com MIC > 64 µg/mL). Em relação aos resistentes pelo GeneXpert®MTB/RIF foram 13/27 e os do MIC-REMA 12/27 (um isolado com MIC < 0,125 µg/mL).

Na figura 1a e 1b está demonstrado o MIC-REMA dos 27 isolados, sendo 12/27 resistente a RIF (4/12 isolados com moderado nível de resistência e 8/12 com alto nível de resistência). O MIC-REMA para isoniazida foram 14/27 resistentes (2/14 isolados com baixo nível de resistência, 3/14 moderado nível de resistência e 9/14 com alto nível de resistência).

Figura 1a: distribuição do MIC da rifampicina *versus* número de isolados

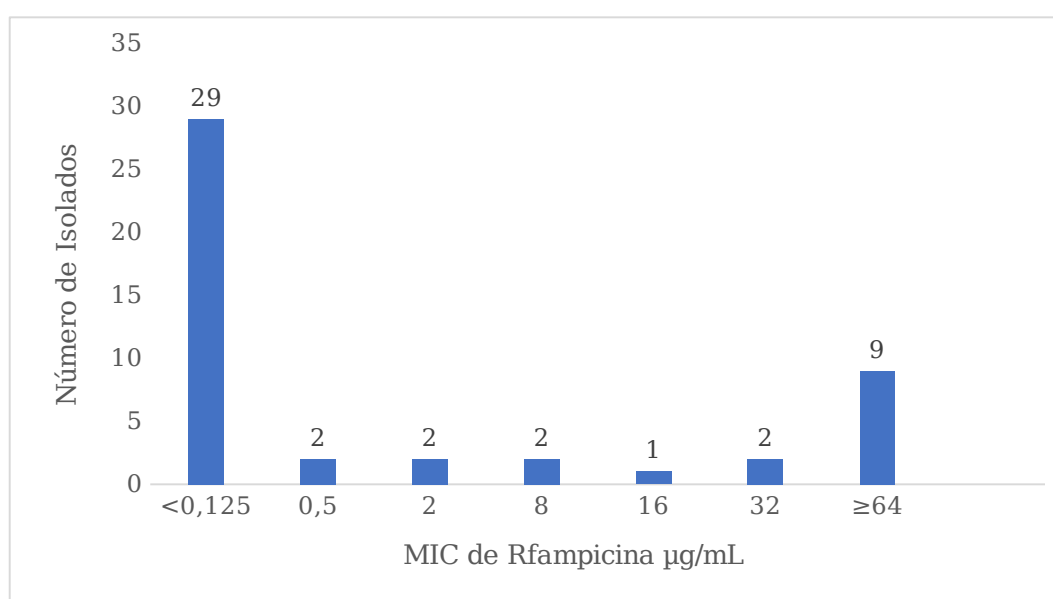
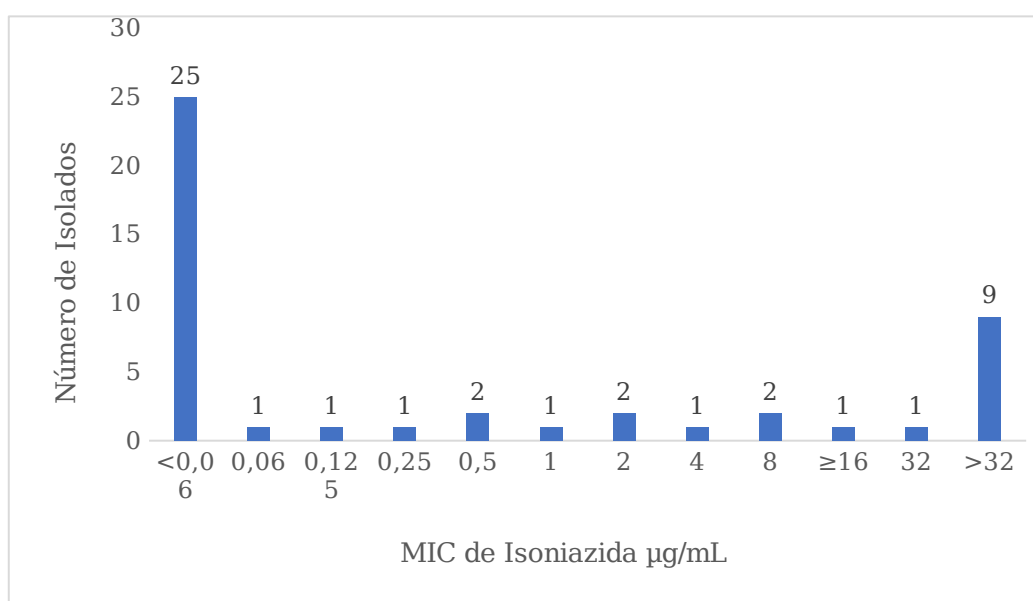




Figura 1b: distribuição do MIC de isoniazida *versus* número de isolados



Em 2/27 foram monorresistentes à INH com MIC  $\geq$  32  $\mu\text{g/mL}$  (alto nível de resistência) e outro MIC = 8,0  $\mu\text{g/mL}$  (moderado nível de resistência).

A concordância entre os resultados do MIC-REMA com o MGIT-960 kit SIRE e o GenoType®MTBDRplus foi de 88,89% para RIF e 85,19% para INH, ambos com kappa  $<$  0,001. A concordância do MIC-REMA com os resultados de RIF do GeneXpert®MTB/RIF foi de 88,89% (kappa  $<$  0,001).

Não houve discordância na leitura dos MIC-REMA entre os observadores.

## Discussão

Atualmente, a maioria dos pacientes que recebem tratamento para TB-RR recebem regimes de segunda linha com base em um único resultado genotípico de resistência a RIF, em vez de um perfil de resistência a todos os fármacos que compõem o tratamento para TB de primeira e segunda linha (12, 13). Este único resultado genotípico assume que uma gama de mutações na região determinante de

resistência do gene *rpoB* conferem o mesmo grau de resistência a R e ignora as complexidades na interpretação dos resultados de TS (14).

Nesse sentido, é desejável fornecer mais detalhes nos relatórios, como a presença de alguma mutação que idealmente deve ser complementada com o nível de concentração do fármaco (15).

A OMS indica métodos genotípicos como principal opção para liberação rápida de resultados de TS em TB, entretanto em locais com poucos recursos esses não se aplicam pelo alto custo e falta de infra-estrutura laboratorial compatível com a exigência para realização desses métodos como o GenoType®MTBDR*plus*. Como alternativa de menor custo, a OMS recomendou métodos não comerciais, dentre eles o REMA, viável nesses locais (4).

No presente estudo, MIC-REMA apresentou boa concordância quando comparado com o MGIT 960 *kit* SIRE, o GenoType®MTBDR*plus* e GeneXpert®MTB/RIF com  $\kappa < 0,001$ . Não encontramos estudos com avaliações que utilizaram os mesmos métodos para uma melhor correlação dos resultados do presente com um estudo similar.

Entretanto, ao avaliar os resultados de estudo que comparou o desempenho do GenoType®MTBDR*plus* com MGIT 960 *kit* SIRE para a detecção de resistência aos fármacos de primeira (RIF e INH) e segunda linha, este mostrou excelente concordância ( $\kappa=0,93$ ) para INH quando comparado com MGIT 960 enquanto houve boa concordância ( $\kappa = 0,6-0,7$ ) entre os dois métodos para RIF (16).

Embora não houvesse comparação com MIC, objeto do presente estudo, os métodos utilizados em nosso estudo como referência mostraram que são comparáveis e recomendados como as melhores opções de métodos genotípicos e fenotípicos (4).

A determinação do MIC é fundamental para melhor discriminação do nível da resistência. Assim, quando comparadas com mutações nos genes de resistência, podem ser associadas às diferentes faixas de MIC. A detecção do gene *rpoB* S450L e do gene *katG* S315T foram associadas a altos níveis de MIC para RIF e INH, respectivamente. No entanto, outras mutações no mesmo gene *rpoB* e no gene *inhA* para INH foram associadas à baixo nível de resistência. (14).

Quando a resistência à RIF e INH se encontram em níveis baixos, estes fármacos podem ser mantidos no esquema terapêutico com ajuste da dosagem favorecendo melhor resposta clínica, evitando o uso de fármacos de segunda linha que são menos efetivos, com maiores efeitos adversos, pior adesão, além de serem mais caros (12,14,16).

Nesse estudo, observamos que as mutações encontradas no gene *rpoB* estavam relacionadas com MIC de níveis moderado a alto (exceto um isolado), o que está de acordo com outros autores, em que não há indicação de mudança no esquema terapêutico, o mesmo acontecendo com a mutação no gene *katG* (16). Em um isolado houve mutação apenas no gene *inhA* com MIC < 0,060 µg/mL, neste caso a dose de INH em concentrações maiores pode ser administrada e mantida no tratamento. (12).

As principais fontes de discordâncias entre os métodos genotípicos e fenotípicos são a heteroresistência, quando coexistem isolados sensíveis e resistentes numa mesma população bacteriana, com proporção de bacilos resistentes em níveis baixos e abaixo do limite de detecção do método (17), os métodos genotípicos têm limites variados para detectar baixas frequências de resistência (< 20%) enquanto os fenotípicos têm limites menores, em torno de 1% da população total. (16).

Outro fator associado à variação nos métodos fenotípicos refere-se às concentrações dos fármacos que podem ter interferência com a dissolução, estabilidade e interação *in vitro* com o meio de cultura, sendo particularmente problemático para isolados onde o nível de resistência encontra-se próximo da concentração crítica (18, 19). Entretanto, neste trabalho, foram observadas poucas discordâncias entre os métodos avaliados.

O número relativamente pequeno de isolados, uma limitação do presente estudo, não permitiu apresentar maiores conclusões sobre o efeito da maioria das mutações de resistência na sensibilidade aos fármacos e ou sobre outros fatores no efeito ao nível da resistência, no entanto, os resultados que apresentamos são uma contribuição importante para o conhecimento dos perfis de sensibilidade de TS do *M. tuberculosis* em nosso ambiente.

A leitura é realizada pela mudança de cor do indicador de crescimento, sem necessidade do uso de equipamentos. A maior desvantagem é a necessidade de laboratório de Biossegurança B3, o mesmo exigido para realização de outros métodos de TS fenotípicos ou genotípicos em que se utiliza isolados clínicos (20).

Neste estudo, demonstramos que a determinação do MIC por meio do método REMA é uma alternativa aos métodos convencionais de TS, é relativamente rápido, aplicável à laboratórios de micobacteriologias que executam outros métodos de TS, fornece dados quantitativos sobre a sensibilidade aos fármacos de primeira e segunda linha, facilitando assim a tomada de decisão terapêutica e o monitoramento de medicamentos terapêuticos para otimizar a eficácia do tratamento (12), acrescenta-se que também sua utilidade quando avaliado em conjunto com outros métodos.

Conclui-se que, o MIC-REMA concorda com os testes fenotípicos e genotípicos para RIF e INH, e pode ser utilizado principalmente em países que dependem de equipamentos e insumos importados como os testes automatizados e genotípicos, que os tornam como fator complicador para utilização em países com poucos recursos.

## **Referências**

1. World Health Organization (WHO), Global Tuberculosis Report, 2020, ISBN 978-92-4-001313-1 (electronic version).
2. Epidemiological Bulletin. Health Surveillance Secretariat. Brasil 2021.
- 3 World Health Organization (WHO), Operational handbook on tuberculosis Rapid diagnostics for tuberculosis detection. Module 3: Diagnosis Rapid diagnostics for tuberculosis detection. 2020.
- 4 World Health Organization (WHO) et al. Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis: policy statement. 2011.
- 5 Cambau E, Viveiros M, Machado D, Raskine L, Ritter C, Tortoli E, Matthys V, Hoffner S, Richter E, Perez Del Molino ML, Cirillo DM, van Soolingen D, Böttger EC. Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic

assessment in a European multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Mar;70(3):686-96.

6 World Health Organization (WHO). Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. 2011.

7 Silva SC, Vater MC, Ramalho DM, Almeida IN, Miranda SS, Kritski A. Cost-effectiveness of Xpert® MTB/RIF in the diagnosis of tuberculosis: pragmatic study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2021;54.

8 World Health Organization (WHO). The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin: policy update.2016.

9 Siddiqi SH, Rüsç-Gerdes S. For BACTEC™ MGIT 960™ TB System (Also applicable for Manual MGIT); 2006.

10 World Health Organization (WHO). Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). 2021.

11 Ruesen C, Riza A.L, Florescu A, Chaidir L, Editoiu C, Aalders N, Nicolosu D, Grecu V, Ioana M, van Crevel R and van Ingen J. (2018). Linking minimum inhibitory concentrations to whole genome sequence-predicted drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from Romania. *Scientific reports*, 8(1), 1-8.

12 Miotto P, Tessema B, Tagliani E, Chindelevitch L, Starks AM, Emerson C, Hanna D, Kim PS, Liwski R, Zignol M, Gilpin C. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *European Respiratory Journal.* 2017 Dec 1;50(6).

13 Dookie, N., Rambaran, S., Padayatchi, N., Mahomed, S., & Naidoo, K. (2018). Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1138-1151.

14. Heyckendorf J, Andres S, Köser CU, Olaru ID, Schön T, Sturegård E, Beckert P, Schleusener V, Kohl TA, Hillemann D, Moradigaravand D, Parkhill J, Peacock SJ, Niemann S, Lange C, and Merker M. (2018). What is resistance? Impact of phenotypic versus molecular drug resistance testing on therapy for multi-and extensively drug-resistant tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(2).
15. Domínguez J, Boettger EC, Cirillo D, Cobelens F, Eisenach KD, Gagneux S, Hillemann D, Horsburgh R, Molina-Moya B, Niemann S, Tortoli E. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *The international journal of tuberculosis and lung disease*. 2016 Jan 1;20(1):24-42.
16. Lee J, Armstrong DT, Ssenooba W, Park JA, Yu Y, Mumbowa F, Namaganda C, Mboowa G, Nakayita G, Armakovitch S, Chien G, Cho SN, Via LE, Barry CE 3rd, Ellner JJ, Alland D, Dorman SE, Joloba ML. Sensititre MYCOTB MIC plate for testing *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to first- and second-line drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):11-8.
17. Coban AY, Deveci A, Sunter AT, Palomino JC, Martin A. Resazurin microtiter assay for isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: Updated meta-analysis. *Int J Mycobacteriol*. 2014 Dec;3(4):230-41.
18. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility test methods: mycobacteria, nocardia, and other actinomycetes. *Manual of clinical microbiology*, 1356-1378. Woods, G. L., Lin, S. Y. G., & Desmond, E. P. (2015).
19. Folkvardsen DB, Thomsen VØ, Rigouts L, Rasmussen EM, Bang D, Bernaerts G, Werngren J, Toro JC, Hoffner S, Hillemann D, Svensson E. Rifampin heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* cultures as detected by phenotypic and genotypic drug susceptibility test methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013 Dec 1;51(12):4220-2.
20. Nateche F, Martin A, Baraka S, Palomino JC, Khaled S, Portaels F. Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in

*Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. Journal of medical microbiology. 2006 Jul 1;55(7):857-60.

### Artigo versão em Inglês

#### Title

Comparison of the Minimum Inhibitory Concentrations for *Mycobacterium tuberculosis* by REMA to the MGIT-960<sup>®</sup> SIRE kit, GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus, and GeneXpert<sup>®</sup> MTB/RIF

Maria de Fátima Filardi Oliveira Mansur<sup>1</sup>, Lida Jouca de Assis Figueredo<sup>1</sup>, Isabela Neves de Almeida<sup>2</sup>, Valéria Martins Soares<sup>3</sup>, Cláudio Augusto José<sup>4</sup>, Élide Aparecida Leal<sup>4</sup>, João Paulo Amaral Haddad<sup>1</sup>, Wânia da Silva Carvalho<sup>1</sup>, Silvana Spíndola de Miranda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup> Hospital Júlia Kubitschek da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

<sup>4</sup> Fundação Ezequiel Dias, Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

## Abstract

**BACKGROUND:** Rapid diagnosis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* is a challenge in low-income countries. Colorimetric redox-indicator methods such as the Resazurin Microtiter Assay (REMA) are relatively new and have been recommended by the World Health Organization as tests to determine sensitivity to antitubercular drugs.

**OBJECTIVES:** To compare the results of the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) for *Mycobacterium tuberculosis* using the REMA method and the MGIT-960 SIRE kit (BD BACTEC™ MGIT™ 960 System), GenoType® MTBDRplus, and GeneXpert® MTB/RIF.

**METHODS:** The study included 27 clinical isolates of *M. tuberculosis* (14 sensitive and 13 resistant) using the MGIT-960 SIRE kit. MIC was found using the REMA method (MIC-REMA), and genotypic tests were performed with GenoType® MTBDRplus and GeneXpert® MTB/RIF. Fisher's exact test was used to compare the methods.

**FINDINGS:** The agreement of the results between MIC-REMA and the MGIT-960 SIRE kit, and MIC-REMA and GenoType® MTBDRplus was 88.89% for rifampicin (RIF) and 85.19% for isoniazid (INH) ( $\kappa < 0.001$ ). The agreement of the results between MIC-REMA and GeneXpert® MTB/RIF was 88.89% for RIF ( $\kappa < 0.001$ ).

**MAIN CONCLUSIONS:** The MIC-REMA results proved to be highly consistent with phenotypic and genotypic tests for RIF and INH.

**Keywords:** *M. tuberculosis*; resazurin assay; multidrug-resistant tuberculosis; Antimicrobial Sensitivity Tests.

Financial support

Minas Gerais State Research Support Foundation (APQ 03266-13/APQ 00094-12 (FAPEMIG), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 446796/2014 and 310174/2017-7).



## Introduction

The incidence rate of tuberculosis (TB) in 2019 was approximately 10 million new cases and 1.2 million deaths per year worldwide. There was a 10% increase in multidrug-resistant TB (MDR-TB) from 2018. (1) In the same period, 73,864 new TB cases were diagnosed in Brazil, which corresponded to an incidence coefficient of 35.0 cases for every 100,000 inhabitants. In 2020, 913 cases of drug-resistant TB (DR-TB) were diagnosed in the country. (2)

According to recommendations of the World Health Organization (WHO), sensitivity tests (ST) for anti-TB drugs should be performed for all patients diagnosed with TB. Colorimetric Redox-indicator (CRI) methods are indirect methods based on the redox reaction of a redox-indicator added to the liquid culture media of a microtiter plate that, after exposure to clinical isolates of *M. tuberculosis*, detects growth under different drug concentrations. (3)

The WHO recommends the *Resazurin Microtiter Assay Method* (REMA) as an appropriate test for determining Minimum Inhibitory Concentration (MIC), which can be used in places where genotypic or automated methods are not available. (4) The MGIT-960 SIRE kit is a high-performance automated system used for primary isolation and sensitivity testing of the first-line anti-TB drugs: streptomycin, isoniazid, rifampicin, and ethambutol. Recently, the EpiCenter Software, version 5.53, was developed with the TB eXiST module, which automatically records readings, controls incubation times, creates graphical representations of the growth unit (GU) values, which, in turn, allows us to establish a quantitative ST for *M. tuberculosis*. However, its disadvantages include its high cost, and the necessity for computerized systems, complex laboratory structures, and a highly specialized professional team. (3, 5)

The WHO recommends the use of GeneXpert<sup>®</sup> MTB/RIF as a substitute for sputum smear microscopy since its technology is easy to implement and execute. This test provides accurate, fast results and can be used in peripheral laboratories. It has high sensitivity and specificity for the simultaneous detection of *M. tuberculosis* and the *rpoB* gene mutation associated with resistance to rifampicin (RIF). Although subsidized, its cost depends on the value of the dollar, and it has a high maintenance cost (6,7), and only a few municipalities in Brazil have this equipment.

The line probe assay with GenoType<sup>®</sup> MTBDR*plus* detects genes resistant to RIF (*rpoB*) and isoniazid (INH) (*inhA* and *katG*). This method is technically more complex, and since it is a genotypic method, does not offer quantitative results to evaluate the level of resistance. (8)

The objective of this study was to compare the results of the Minimum Inhibitory Concentration for *M. tuberculosis* by the REMA method to the MGIT-960 SIRE kit, GenoType<sup>®</sup> MTBDR*plus*, and GeneXpert<sup>®</sup> MTB/RIF.

### **Materials and methods**

This study used clinical isolates of *M. tuberculosis* from patients at Hospital Júlia Kubitscheck (HJK), a referential center for elderly care, and the Hospital das Clínicas of UFMG (HC/UFMG), a highly complex hospital system.

A total of 27 clinical isolates (14 sensitive and 13 resistant) were included in this study.

We performed the sensitivity tests with the MGIT-960 SIRE kit at the Mycobacteria Laboratory of the Ezequiel Dias Foundation, a referential laboratory in the state of Minas Gerais. (9)

### *Ethics*

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), under protocol number CAAE: 95206318.3.0000.5149.

### *MIC-REMA Method*

We used the following drug concentration ranges: 64 µg/mL – 0.125 µg/mL for RIF and 32 µg/ml – 0.060 µg/ml for INH.

We conducted REMA tests at the Mycobacterial Research Laboratory of the School of Medicine/UFMG. We prepared the bacterial suspensions by transferring the colonies grown in Löwenstein-Jensen (LJ) media to 7H9 Middlebrook liquid media supplemented with OADC (oleic acid, albumin, dextrose, and catalase) and compared them with the McFarland 1 standard. Subsequently, we diluted them to 1:10 and distributed them in sterile, 96-well microtiter plates with a lid (4,10). The

strain ATCC 27294, H<sub>37</sub> R<sub>v</sub> sensitive and the RIF-resistant ATCC 35837 and INH-resistant ATCC 35838 strains were used as internal controls for MIC-REMA readings.

We distributed 100 µL of 7H9 + OADC in the microplate wells and then diluted 100 µL of the abovementioned drugs with multichannel pipettes. Finally, 100 µL of 1:10 bacterial suspension was transferred to all wells, except for the peripheral wells that were filled with 200 µL of sterile water. Duplicate tests were prepared for each isolate, which were incubated at 37°C for the following seven days. We added 30 µL of 0.02% resazurin solution to both the wells with drugs and the control wells. The microplates were incubated for 24 hours, and the change in color was evaluated. If there was no change in color, they were incubated for another 24 hours for a final reading.

The reading consisted of the visual observation of a change in color from blue to pink, which indicates bacterial growth. Therefore, the MIC was determined based on the lowest concentration of the drug that prevented the color change, that is, where growth of *M. tuberculosis* had been inhibited by the drug. The results were assessed by two independent observers. If any disagreements arose, another observer was consulted. The cutoff points for distinguishing between resistant and sensitive isolates were RIF ≤ 1.0 µg/mL and INH ≤ 0.25 µg/ML. (11,12)

For RIF, we classified values for MIC > 20 µg/mL as a high level of resistance, MIC > 4 µg/mL and ≤ 20 µg/mL as moderate, and MIC > 1.0 µg/mL and ≤ 4.0 µg/mL as low. For INH, values of MIC > 0.25 µg/mL and ≤ 1.0 µg / mL were classified as low, MIC > 1.0 µg/mL and ≤10 µg/mL as moderate, and MIC > 10 µg/mL as high. (12)

#### *GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus and GeneXpert<sup>®</sup> MTB/RIF methods*

We used the GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus method to detect mutations in the *rpoB* and *katG* genes and in the *inhA* promoter region of the clinical isolates and the GeneXpert<sup>®</sup> MTB/RIF to detect the *M. tuberculosis* complex and mutations of *rpoB* directly from the clinical samples. These tests were performed following the manufacturer's recommendations. (6,8)

To analyze the results, we used the Stata software, version 15 (StataCorp, College Station, TX, USA), and Fisher's exact test to assess the agreement between the results obtained for RIF and INH.

## Results

### *Comparison of the results between MIC-REMA (RIF and INH) and the MGIT-960 SIRE kit*

For RIF, the number of sensitive isolates detected were 14/27 by the MGIT-960 SIRE kit and 15/27 by MIC-REMA (one isolate with MIC > 64 µg/mL). There were 13/27 resistant isolates detected by the MGIT-960 SIRE kit and 12/27 by MIC-REMA (one isolate with MIC = 0.250 µg/mL).

For INH, the number of sensitive isolates detected were 13/27 by the MGIT-960 SIRE kit and 11/27 by MIC-REMA (two isolates with MIC = 1.0 µg/mL). There were 16/27 resistant detected isolates by the MGIT-960 SIRE kit and 14/27 by MIC-REMA (one isolate with MIC <0.060 µg/mL and one MIC = 0.060 µg / mL).

The number of MDR results observed were 13/27 by the MGIT-960 SIRE kit and 12/27 by MIC-REMA (one RIF isolate with MIC = 0.125 µg/mL and one INH isolate with MIC = 0.060 µg/mL).

### *Comparison of the results between MIC-REMA (RIF and INH) and GenoType® MTBDRplus*

For RIF, there were 14/27 sensitive isolates detected by GenoType® MTBDRplus, compared to 13/27 by MIC-REMA (one isolate with MIC > 64 µg/mL). There were 13/27 resistant isolates detected by GenoType® MTBDRplus and 14/27 by MIC-REMA (one isolate with MIC <0.125 µg/mL).

For INH, there were 12/27 sensitive isolates detected by GenoType® MTBDRplus and 13/27 by MIC-REMA (one isolate with MIC = 1.0 µg/mL). There were 15/27 resistant isolates detected by GenoType® MTBDRplus and 14/27 by MIC-REMA (one isolate with MIC <0.060 µg/mL).

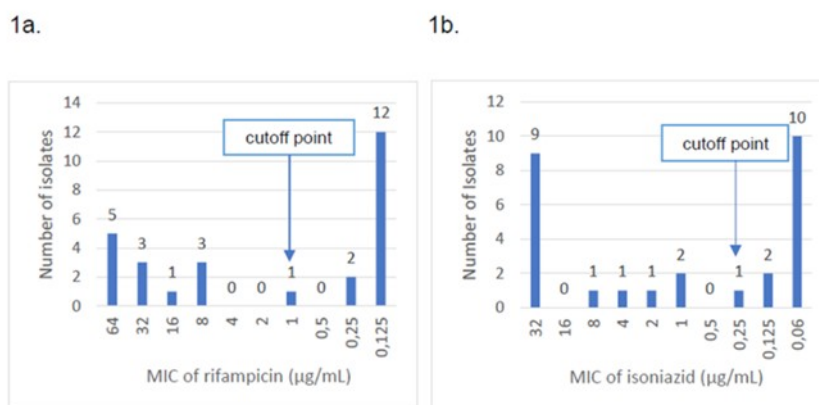
The number of MDR results detected by GenoType® MTBDRplus were 13/27, compared to 12/27 by MIC-REMA (one RIF isolate with MIC = 0.125 µg/mL and one INH isolate with MIC = 0.060 µg/mL).

*Comparison of the results between MIC-REMA (RIF) and GeneXpert® TB/RIF*

For RIF, there were 14/27 sensitive isolates detected by GeneXpert® MTB/RIF and 15/27 by MIC-REMA (one isolate with MIC > 64 µg/mL). There were 13/27 resistant isolates detected by GeneXpert® MTB/RIF and 12/27 by MIC-REMA (one isolate with MIC < 0.125 µg/mL).

Figures 1a and 1b demonstrate the MIC-REMA results for the 27 isolates, 12 of which were resistant to RIF (4/12 isolates with a moderate resistance level and 8/12 with a high resistance level). For INH, there were 14/27 resistant isolates detected by the MIC-REMA method (2/14 isolates with a low resistance level, 3/14 with a moderate level, and 9/14 with a high resistance level).

Image 1a e 1b: Minimum Inhibitory Concentration of Rifampicin and Isoniazid (n = 27)



MIC: Minimum Inhibitory Concentration

Two of the 27 isolates were monoresistant to INH, with values of MIC ≥ 32 µg/mL (high resistance) and MIC = 8.0 µg/mL (moderate resistance).

The agreement of the results between MIC-REMA and the MGIT-960 SIRE kit and MIC-REMA and GenoType® MTBDRplus was 88.89% for RIF and 85.19% for INH,

both with kappa <0.001. For RIF, the agreement between the MIC-REMA and GeneXpert® MTB/RIF results was 88.89% (kappa <0.001).

No disagreements arose among the observers regarding the MIC-REMA readings.

## Discussion

After reviewing the main studies in Brazil on the subject, this is the only study to determine MIC by REMA and to compare the results with genotypic methods.

When the WHO consolidated the TB guidelines in 2020, “Rapid diagnostics for tuberculosis detection,” the document included new recommendations on molecular assays intended as initial tests for diagnoses of pulmonary and extrapulmonary TB and resistance to rifampicin in adults and children. (3) Therefore, determining MIC is fundamental to better discriminate the level of resistance. Compared to mutations in the resistance genes, they can be associated with different ranges of MIC. Detection of the *rpoB* S450L gene and the *katG* S315T gene was associated with high levels of MIC for RIF and INH, respectively. However, other mutations in the same *rpoB* gene and the *inhA* gene for INH have been associated with a low level of resistance. (13) When resistance to RIF and INH is low, it can be maintained in the therapeutic regimen by adjusting the dosage to achieve a more favorable clinical response, thus avoiding the use of second-rate drugs that are less effective, present greater adverse effects and worse adherence, and are more expensive. (12– 14)

In this study, we observed that the mutations found in the *rpoB* gene were related to moderate to high MIC levels (except one isolate with a low level of resistance, where there would be no indication of change in the therapeutic regime) (14). We also observe that occurred mutations in the *katG* gene, however in one isolate, there was a mutation only in the *inhA* gene with MIC <0.060 µg/mL, in which case doses of INH in higher concentrations can be administered and maintained in the treatment. (12)

A study that applied REMA demonstrated its effective accuracy in comparison to the proportion method (PM), wherein sensitivity to RIF and INH was 100% and specificity was 99.2% and 98.3%, respectively. (15) Another study employed the Sensititre MYCOTB (MYCOTB; Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH) commercial test for MIC in non-colorimetric microplates and REMA and compared the results with the PM, in a country with a high prevalence of MDR-TB and XDR-TB (Extensively

resistant TB). These authors report that in relation to Sensititre MYCOTB, it should not be recommended as a substitute for the PM, requiring further studies due to disagreements over the results for RIF. (16)

In a meta-analysis, which assessed sensitivity and specificity by the area under the curve, the values for RIF and INH were 0.99 and 0.98, respectively. This study indicated a high level of general accuracy in the comparison between REMA and the MGIT- 960 SIRE kit. (17) We obtained similar results in our study with a high level of agreement with the MGIT-960 SIRE kit.

The main disagreements between of genotypic and phenotypic methods are heteroresistance, when sensitive and resistant isolates coexist in the same bacterial population with a low proportion of resistant bacilli under the limit of detection for the method (18), genotypic methods have varying limits for detecting low levels of resistance (<20%), while phenotypic methods have lower limits, at around 1% of the total population. (14) Another factor associated with the variation in phenotypic methods refers to the concentrations of drugs that may interfere with the dissolution, stability, and *in vitro* interaction of the culture medium, which is particularly problematic for isolates whose resistance level is close to the critical concentration. (19,20) However, in our study there were few disagreements between the results of MIC-REMA and GenoType<sup>®</sup> MTBDRplus, and MIC-REMA and GeneXpert<sup>®</sup> MTB/RIF.

Determining MIC by the REMA method resulted in effective accuracy, and this method can be implemented in places with few resources as it is technically easy and fast. The reading is determined by a change in color of the growth indicator, and does not require the use of equipment. The biggest disadvantage is the need for a B3 Biosafety laboratory, the same required for other phenotypic or genotypic ST methods using clinical isolates (21).

The main limitation of this study is the number of isolates.

In conclusion, the MIC-REMA method proved to agree with the phenotypic and genotypic tests for RIF and INH, and could therefore be used mainly in countries that depend on imported equipment and inputs such as automated and genotypic tests, whose use represents a complication in countries with limited resources.

Acknowledgements:

The authors wish to acknowledge Universidade Federal de Minas Gerais. We would also like to thank the Post-Graduate Program in Health Sciences: Sciences Applied to Adult Health, the Universidade Federal de Minas Gerais School of Medicine; CAPES, for their support and encouragement in this work, the Ezequiel Dias Foundation, and the Brazilian Tuberculosis Network (REDE TB).

## References

1. World Health Organization (WHO), Global Tuberculosis Report, 2020, ISBN 978-92-4-001313-1 (electronic version).
2. Epidemiological Bulletin. Health Surveillance Secretariat. Brasil 2021.
3. World Health Organization (WHO), Operational handbook on tuberculosis Rapid diagnostics for tuberculosis detection. Module 3: Diagnosis Rapid diagnostics for tuberculosis detection. 2020.
4. World Health Organization (WHO) et al. Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis: policy statement. 2011.
5. Cambau E, Viveiros M, Machado D, Raskine L, Ritter C, Tortoli E, Matthys V, Hoffner S, Richter E, Perez Del Molino ML, Cirillo DM, van Soolingen D, Böttger EC. Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Mar;70(3):686-96.
6. World Health Organization (WHO). Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. 2011.
7. Silva SC, Vater MC, Ramalho DM, Almeida IN, Miranda SS, Kritski A. Cost-effectiveness of Xpert® MTB/RIF in the diagnosis of tuberculosis: pragmatic study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2021;54.



- 8 World Health Organization (WHO). The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin: policy update.2016.
- 9 Siddiqi SH, Rüsç-Gerdes S. For BACTEC™ MGIT 960™ TB System (Also applicable for Manual MGIT); 2006.
- 10 World Health Organization (WHO). Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). 2021.
- 11 Ruesen C, Riza A.L, Florescu A, Chaidir L, Editoiu C, Aalders N, Nicolosu D, Grecu V, Ioana M, van Crevel R and van Ingen J. (2018). Linking minimum inhibitory concentrations to whole genome sequence-predicted drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from Romania. *Scientific reports*, 8(1), 1-8.
- 12 Miotto P, Tessema B, Tagliani E, Chindelevitch L, Starks AM, Emerson C, Hanna D, Kim PS, Liwski R, Zignol M, Gilpin C. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *European Respiratory Journal*. 2017 Dec 1;50(6).
- 13 Dookie, N., Rambaran, S., Padayatchi, N., Mahomed, S., & Naidoo, K. (2018). Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1138-1151.
14. Heyckendorf J, Andres S, Köser CU, Olaru ID, Schön T, Sturegård E, Beckert P, Schleusener V, Kohl TA, Hillemann D, Moradigaravand D, Parkhill J, Peacock SJ, Niemann S, Lange C, and Merker M. (2018). What is resistance? Impact of phenotypic versus molecular drug resistance testing on therapy for multi-and extensively drug-resistant tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(2).
15. Domínguez J, Boettger EC, Cirillo D, Cobelens F, Eisenach KD, Gagneux S, Hillemann D, Horsburgh R, Molina-Moya B, Niemann S, Tortoli E. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *The international journal of tuberculosis and lung disease*. 2016 Jan 1;20(1):24-42.

16. Lee J, Armstrong DT, Ssenooba W, Park JA, Yu Y, Mumbowa F, Namaganda C, Mboowa G, Nakayita G, Armakovitch S, Chien G, Cho SN, Via LE, Barry CE 3rd, Ellner JJ, Alland D, Dorman SE, Joloba ML. Sensititre MYCOTB MIC plate for testing Mycobacterium tuberculosis susceptibility to first- and second-line drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):11-8.
17. Coban AY, Deveci A, Sunter AT, Palomino JC, Martin A. Resazurin microtiter assay for isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin resistance detection in Mycobacterium tuberculosis: Updated meta-analysis. *Int J Mycobacteriol.* 2014 Dec;3(4):230-41.
18. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility test methods: mycobacteria, nocardia, and other actinomycetes. *Manual of clinical microbiology*, 1356-1378. Woods, G. L., Lin, S. Y. G., & Desmond, E. P. (2015).
19. Folkvardsen DB, Thomsen VØ, Rigouts L, Rasmussen EM, Bang D, Bernaerts G, Werngren J, Toro JC, Hoffner S, Hillemann D, Svensson E. Rifampin heteroresistance in Mycobacterium tuberculosis cultures as detected by phenotypic and genotypic drug susceptibility test methods. *Journal of Clinical Microbiology.* 2013 Dec 1;51(12):4220-2.
20. Nateche F, Martin A, Baraka S, Palomino JC, Khaled S, Portaels F. Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in Mycobacterium tuberculosis in Algiers. *Journal of medical microbiology.* 2006 Jul 1;55(7):857-60.

## **ESTUDO II - AVALIAÇÃO DO *kit* SIRE-NITRATASE DIRETO DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ANTI-TUBERCULOSE DE PRIMEIRA LINHA**

### **6 INTRODUÇÃO**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a tuberculose (TB) como epidemia global e grave problema de saúde pública mundial há duas décadas. Em seu último relatório os números mostram que a doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*), continua como líder em causa de mortes por um único agente infeccioso, com números elevados de novos casos e com aumentos a nível global da resistência aos fármacos de primeira e segunda linha (WHO 2020a).

A nível global, o número total de casos em 2020 foi de aproximadamente 10,4 milhões no mundo, sendo 208.000 em pessoas coinfectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV/AIDS) TB - HIV/AIDS que está associado a alta morbidade e mortalidade, e cerca de 1,4 milhões de mortes (WHO 2020a).

O Brasil encontra-se entre os 30 países de com maiores números de casos de TB e coinfeção TB-HIV com 9,5% (11.000 pessoas) em 2019, a OMS considera o controle da doença nesse grupo de países como prioritários para o mundo (WHO 2021).

Em 2020, no Brasil foram registrados 66.819 novos casos de TB, com um coeficiente de incidência de 31,6 casos por 100 mil habitantes, e notificados cerca de 4,5 mil óbitos pela doença, com um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos por 100 mil habitantes (Brasil 2021).

Em Minas Gerais no ano de 2020, foram notificados um total de 3.940 casos, com 3.450 de casos novos e 490 de reingressos. As cidades de Belo Horizonte, Juiz de

Fora e Uberlândia representaram 41,6% do total de casos, mostrando que a TB concentra em cidades mais populosas. (Boletim Epidemiológico-TB/SES/ Minas Gerais. 2021).

Com relação à TB resistente aos fármacos (TB-DR) foram registrados aproximadamente 470 mil casos em 2020. Desde então, a TB-XDR foi detectada em mais de 50 países em todo o mundo. (WHO 2020a).

Novas definições de TB-DR foram propostas pela OMS em janeiro de 2021, com o objetivo de padronizar os perfis de resistência para fins de diagnósticos, tratamentos e epidemiologia.

✓ TB pré-XDR: TB causada por isolados de *M. tuberculosis* que atendem à definição de TB multirresistente e resistente à rifampicina (TB MDR/RR) mais resistência a qualquer fluoroquinolona. (WHO 2021).

✓ TB-XDR: TB causada por isolados de *M. tuberculosis* que são TB-MDR/RR mais resistência a qualquer fluoroquinolona (FQ) e também a pelo menos um medicamento adicional do Grupo A, grupo mais potente de medicamentos na classificação de fármacos de segunda linha para o tratamento de formas de TB resistentes e que usam regimes de tratamento mais longos e incluem levofloxacina (LFX), moxifloxacina (MOX), bedaquilina (BDQ) e linezolida (LNZ).

✓ A definição de TB-MDR permaneceu inalterada: resistência de isolados de *M. tuberculosis* a pelo menos isoniazida (INH) e rifampicina (RIF), fármacos básicos para o tratamento da TB. A TB-RR (definida como TB resistente à RIF pelo teste rápido molecular- TRM) e requer um manejo clínico semelhante ao da TB-MDR.

As duas definições de TB pré-XDR e TB-XDR apontam para uma progressão crescente da gravidade da doença, devido à resistência a fármacos adicionais podendo tornar o tratamento sem opções terapêuticas (WHO 2021).

O aumento do número de casos da TB-DR, tem preocupado os órgãos de controle da doença e pela dificuldade do tratamento com consequências epidemiológicas importantes. Alguns fatores contribuem para sua disseminação, mas, principalmente pela coinfeção TB-HIV/AIDS, baixo nível socioeconômico, moradias precárias, falhas nos programas de controle da epidemia, limitações de diagnóstico e

tratamento como a identificação do *M. tuberculosis* e obtenção do TS aos fármacos anti-tuberculose nos países sub-desenvolvidos e em desenvolvimento (OMS 2020a).

Os pacientes com TB e TB-DR que vivem em países com altas taxas de pessoas infectadas e com TB-HIV/AIDS, e que permanecem em suas comunidades por períodos longos sem serem diagnosticados ou com tratamento adequado, colocam os pacientes em risco de falha do tratamento e mortes permitindo a fácil disseminação da doença para a comunidade (WHO 2014).

Fatores comportamentais e ocupacionais como histórico de contato com pacientes com TB ou com TB-DR, baixa adesão ao tratamento, falha anterior no tratamento da TB, consumo de álcool, comorbidades são apontados como principais fatores para o desenvolvimento de resistência aos fármacos. (Castro et al., 2017; Procop, 2017).

A TB é uma doença da pobreza, e a maioria das mortes ocorrem em países sub-desenvolvidos, e em desenvolvimento, afetando principalmente adultos jovens em seus anos mais produtivos (OMS 2020).

Além disso o controle da epidemia torna-se mais difícil quando os resultados do tratamento da TB-DR, que utilizam fármacos de segunda linha, não apresentam bons resultados. Em 2019 apenas 38% do número estimado de pessoas que desenvolveram TB-MDR/RR receberam tratamento adequado e 57% tiveram sucesso (OMS 2020).

Ressalta-se que o tratamento com os fármacos de segunda linha são mais tóxicos, menos efetivo, e muito mais caro quando comparado com o tratamento padrão que tem como principais e mais importantes fármacos de primeira linha, especificamente a RIF e a INH (WHO 2020).

A OMS por meio do programa Parceria *Stop TB* e o Fundo Global de Luta contra a AIDS, Tuberculose e Malária alerta para a necessidade de ações urgentes e conjuntas para o diagnóstico e tratamento da TB, com a realização desses testes em todos os pacientes, especialmente em locais com poucos recursos. Entre 2018 e 2019, 14,1 milhões de pessoas foram tratadas para TB, 35% da meta de 5 anos (2018–2022) de 40 milhões, 6,3 milhões de pessoas iniciaram o tratamento preventivo de TB em 2018 e 2019, 21% da meta de 5 anos de 30 milhões, vidas

foram salvas por meio de um diagnóstico e tratamento eficazes, ainda assim dois de cada três pacientes com TB-DR não recebem tratamento adequado (WHO 2020).

Para controlar e minimizar o desenvolvimento, a crescente prevalência e a disseminação da TB-DR, é necessário garantir a detecção o mais rapidamente possível de tais pacientes por métodos laboratoriais que sejam mais rápidos, e assim evitar a transmissão. Vale ressaltar que a doença tem cura e no Brasil seu tratamento é disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). (WHO 2020; Brasil 2021).

A detecção desses casos permite a modificação dos regimes de tratamento por outros mais adequados e mais eficazes sendo os elementos chave e essenciais para interromper e controlar o tratamento padrão e sua transmissão. O diagnóstico laboratorial também auxilia na avaliação de resultados em falhas do tratamento, monitoramento terapêutico e para fins epidemiológicos (WHO 2014).

Os métodos para TS ao *M. tuberculosis* frente aos fármacos anti-tuberculose são procedimentos naturalmente complexos. A natureza de crescimento lento do bacilo por métodos convencionais, que exige em torno de três a oito semanas para isolamento e 28 a 42 dias para TS a experiência tecnológica necessária e o alto custo das técnicas não convencionais automatizadas e moleculares que têm tempos de resposta mais curtos (1-21 dias) são alguns dos motivos pelos quais vários países enfrentam dificuldades para a realização e implantação desses testes diagnósticos da TB. (Canetti et al., 1963; Kent e Kubica, 1985; Palomino et al., ).

Em países sub-desenvolvidos e em desenvolvimento e onde há alta prevalência de TB, os testes diagnósticos mais utilizados para a TB incluem a baciloscopia pelo método do Ziehl-Neelsen (ZN), a cultura em meios sólidos, sendo o Löwenstein-Jensen (LJ) o mais comum e o (TS) pelo Método da Proporção Indireto (MP) que é utilizado como método de referência na grande maioria dos países, que é demorado, impactando negativamente na melhor estratégia de tratamento (Rosales et al., 2009).

No Brasil, o diagnóstico laboratorial de TB pulmonar consiste na análise, principalmente do escarro através da realização de baciloscopia, também chamada de pesquisa de BAAR (Bacilo Álcool Ácido Resistente), cultivo microbiológico,

identificação de espécie e TS a fármacos. Resultados bacteriológicos positivos confirmam a TB ativa em pacientes que apresentam quadro clínico sugestivo de TB e em sintomáticos respiratórios (BRASIL, 2008; BRASIL, 2019).

Por aumentar em até 30% o diagnóstico bacteriológico de TB nos casos pulmonares com baciloscopia negativa e apresentar elevada especificidade e sensibilidade, a cultura é considerada o método padrão ouro para investigação de TB (BRASIL, 2008; BRASIL, 2019)

Apesar das desvantagens, o TS fenotípico permanece essencial para fármacos para os quais não existem testes moleculares confiáveis no momento, mas para os quais existem métodos fenotípicos, por exemplo, bedaquilina (BDQ), que é um fármaco utilizado no tratamento de TB-DR. TS fenotípico também é necessário mesmo para fármacos que existem testes moleculares, para investigar discordantes resultados, ou para avaliar resultados de testes moleculares inesperados seja de resistência ou sensibilidade. (WHO 2020b).

Sistemas comerciais automatizados e testes moleculares foram desenvolvidos com o objetivo de redução do tempo de resposta e recomendados pela OMS, mas ainda são muito caros, dificultando a possibilidade de serem adotados em países com poucos recursos (WHO 2018).

No entanto, esses métodos não são usados como testes primários em muitos países tendo em visto o alto custo dos equipamentos e insumos, requisitos de infraestrutura com nível de biossegurança nível 3 (BSL3), recursos humanos com qualificação e rigoroso controle de qualidade ou laboratório de contenção de TB. (WHO 2015).

Segue abaixo, tabela com os principais métodos indicados pela OMS para uso em diagnóstico laboratorial da TB.

Tabela 1: Métodos Diagnósticos Recomendados pela OMS

Método	Descrição	Fenotípico	Genotípico	Fabricante
LED	Sistemas robustos de microscopia baseados em diodos emissores de luz (LEDs)			Zeiss
Culturas Líquidas	Sistema de cultura comercial e TS	X		Bact/ALERT MGIT
Teste <i>Accuprobe</i>	Detecta antígeno do bacilo de cultura líquida ou ágar-sólida			Gen-Probe
CRI Testes Colorimétricos com indicadores redox	Técnica de DST líquido manual, detecta resistência INH e RIF em amostras de cultura após incubação com corantes redox	X		Método não comercial
MODS	Técnica de Cultura Líquida Manual técnica, usa luz de microscópio invertida detectar a bactéria da tuberculose-fator corda	X		Método não comercial
NRA	Técnica de cultura sólida que mede a redução de nitrato para indicam resistência INH e RIF	X		Método não comercial



Testes de Sondas em linha	Teste de tira que detecta simultaneamente bacilos do <i>M. tuberculosis</i> e mutações genéticas que indicam resistência a INH e RIF		X	Genotype R MTBDR e MTBDR plus IINNOOLipa RIF.TB
GeneXpert TB/RIF	Dispositivo que faz extração, amplificação e detecção automatizada de <i>M. tuberculosis</i> e resistência RIF		X	Cepheid GeneXpert

Shenai S 2015.

Para os países com poucos recursos, seria útil utilizar métodos que sejam aplicáveis, fáceis de serem executados, custo-efetivo e reprodutíveis, que apresentem bom desempenho de sensibilidade e especificidade para atingir as metas indicadas pela OMS para avaliar a acurácia, reprodutibilidade, e que seja aplicável e de baixo custo (WHO 2014).

O método do nitrato redutase, *Nitrate Reductase Assay* (NRA) foi desenvolvido pelo Instituto Central de Tuberculose de Pesquisa em Moscou, Rússia, para identificar isolados bacterianos do *M. tuberculosis*, e posteriormente para realizar TS ao fármacos anti-tuberculose e identificar TB-MDR. (Golyshevskaja et al., 1996).

O teste do NRA é baseado na capacidade do *M. tuberculosis* em reduzir o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) como indicador de viabilidade celular, através da atividade da enzima nitrato-redutase. O nitrito produzido na reação é detectado após adição de solução de ácido clorídrico, sulfanilamida e *n*-1 naftiletlenodiamino desenvolvendo coloração rosa imediata. Esta reação foi denominada reação de Griess, após J.P Griess tê-la descrito em 1879. O teste do nitrato é realizado de rotina como teste bioquímico para identificar o *M. tuberculosis*, o que torna o método do NRA altamente específico (Ängeby et al., 2002; Virtanen, 1960).

A técnica para realização do TS de *M. tuberculosis* frente à fármacos de primeira linha: rifampicina (RIF), isoniazida (INH), estreptomicina (S) e etambutol (E) foi descrito primeiramente em alguns estudos (Ängeby et al., 2002; Golyshevskaja et al., 2003).

Detectar a reação por meio de mudança de reativo incolor para cor rosa, em meio livre de fármacos por si só indica uma cultura positiva e sensibilidade aos fármacos e crescimento em ambos os meios sem e contendo fármacos indica resistência. O teste NRA pode ser usado diretamente de amostras clínicas (NRA-D) (o tempo para obtenção dos resultados é menor) ou teste indireto (NRA-I) quando utiliza isolado clínico de cultura (WHO 2011).

Um dos primeiros estudos, foi conduzido por Ängeby et al., em 2002, que demonstrou que o método NRA foi preciso, rápido e de baixo custo para TS indireto de fármacos de primeira linha, rifampicina (RIF), isoniazida (INH), etreptomina (S) e etambutol (E) e facilmente adaptado a qualquer laboratório com capacidade para cultura usando meio Löwenstein-Jensen (LJ).

A partir desse primeiro estudo, muitos outros foram publicados pelo método indireto, com apresentação de muito bons resultados. Desde então, comparações repetidas de NRA-D e NRA-I em comparação com métodos clássicos e novos têm demonstrado que o NRA é preciso, rápido, baixo custo e adaptável a qualquer laboratório que possa realizar culturas de *M. tuberculosis*, características ideais para países de baixos e médios recursos. (Martin A et al., 2005; Solis LA et al., 2005; Musa HR et al., 2005).

Em 2011 foi autorizado pela OMS a utilização de testes rápidos colorimétricos com indicadores de crescimento por oxidação-redução (CRI) não comerciais para a realização de TS aos fármacos anti-tuberculose. (WHO 2011). Dentre eles, um dos mais estudados é o método do NRA por sua aplicabilidade.

A técnica do NRA é simples, rápida e de baixo custo que é realizada em meio sólido LJ e que tem como princípio a capacidade do *M. tuberculosis* metabolicamente ativo em reduzir o nitrato a nitrito pela atividade da enzima nitrato-redutase presente em aproximadamente 99% dos bacilos da TB e pode ser facilmente detectado com a adição de reagente, denominado Reagente Griess, que produz uma mudança de cor visível. (Ängeby et al., 2002).

Em 2013 por meio de uma parceria entre a UFMG e a empresa brasileira PlastLabor® houve transferência de tecnologia para produção do *kit* SIRE/Nitratase

PNB PlastLabor® para esse *kit* foi incluído o ácido *p*-nitrobenzoico (PNB) para identificação do CMTB. (Miranda SS et al., 2017).

O método NRA-I foi validado em seis Laboratórios de Referência de Micobacteriologia, sendo cinco no Brasil e um em Portugal com 190 isolados clínicos. Os resultados obtidos tiveram boa acurácia para os quatro fármacos testados quando comparados com o MP e com o MGIT-960 *kit* SIRE usados como método referência. O tempo médio para leitura e liberação dos resultados foi de sete dias (SS Miranda et al., 2020).

## 7 JUSTIFICATIVA

A implantação do método NRA como teste de sensibilidade aos fármacos anti-tuberculose diretamente de amostras clínicas respiratórias é urgente e necessária, é rápido e produz resultados com acurácia. (Musa HR et al., 2005; WHO 2011).

Essa ferramenta diagnóstica contribuirá para melhor manejo no tratamento do paciente, permitirá conhecer o perfil de resistência na comunidade, além de possibilitar a rápida identificação de casos de TB-DR e de outros perfis de sensibilidade. O tratamento efetivo com resultados clínicos favoráveis constitui uma das contribuições mais importantes nos programas de controle da TB, principalmente em populações co-infectadas TB/HIV-AIDS e outras co-morbididades imunossupressoras (WHO 2018).

O método NRA-D foi avaliado neste estudo com o propósito de padronização e posterior validação em condições de rotina em laboratórios de micobacteriologia no país.

## 8 OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar o desempenho do método *Nitrate Reductase Assay* (NRA) utilizando o *kit* SIRE Nitratase-PNB diretamente de amostras clínicas de escarro, aspirado traqueal e lavado bronco-alveolar na determinação do teste de sensibilidade frente aos fármacos anti-tuberculose de primeira linha: rifampicina (RIF), isoniazida (INH), estreptomicina (S) e etambutol (E).

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Comparar a acurácia pela sensibilidade e especificidade e concordância do pelo *kappa* entre o método SIRE Nitratase-PNB direto de amostras clínicas com o método referência MGIT 960 *kit* SIRE.
- ✓ Estimar o tempo para obtenção dos resultados pelo método SIRE Nitratase-PNB direto de amostras clínicas.

## 9 MATERIAIS E METODOLOGIA

### Local de estudo e origem das amostras

Devido a dificuldade em coletar o TCLE dos participantes serão descritos no resultado a sensibilidade, especificidade, acurácia e kappa.

O presente estudo foi realizado com amostras clínicas respiratórias de dois hospitais da cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais (MG), Brasil. Os referidos hospitais são Hospital das Clínicas/UFMG (HC/UFMG), de alta complexidade e Hospital Júlia Kubitschek (HJK), hospital terciário e que realiza 47% dos diagnósticos de TB do estado de MG (SES/MG 2021).

A média de amostras clínicas recebidas no HC é de 400/ano e de 40 culturas positivas. O HJK recebe anualmente aproximadamente 1440 amostras clínicas para diagnóstico laboratorial da TB utilizando a baciloscopia pelo método ZN, GeneXpert®MTB/RIF e a cultura em meio sólido LJ, mesmas técnicas utilizadas no HC, que utiliza também a baciloscopia pelo método AU, com média de culturas positivas é de 110/ano.

Os TS pelo MGIT 960 *kit* SIRE foram realizados no laboratório Fundação Ezequiel Dias (FUNED), no laboratório do Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas do Instituto Octávio Magalhães (IOM/Funed) que é referência para o diagnóstico da infecção em Minas Gerais, sendo o único laboratório no estado que realiza a identificação do *M. tuberculosis* e o TS aos fármacos recomendados pelo Ministério da Saúde (MS) para tratamento da doença.

Trata-se de um exame de alta complexidade, que envolve o manuseio de isolados do *M. tuberculosis*, que precisam ser obrigatoriamente manipuladas em laboratório de nível de biossegurança 3 (NB3) ou laboratório de contenção.

**Critérios de inclusão:** amostras com baciloscopias positivas realizadas por meio do método Ziehl-Neelsen (ZN) ou pelo método auramina (Au) em que é possível quantificar a carga micobacteriana no escarro, que obedece a seguinte escala de acordo com a concentração do bacilo álcool ácido resistente (B.A.A.R): positivo (POS), quando não é quantificada e utilizada para amostras de aspirado traqueal e

lavado bronco-alveolar (BAL) e escasso (número de bacilos/100campos), +, ++ e ++ + para amostras de escarro.

### **Classificação:**

Escasso: 1–9 BAAR em 100 campos observados, + para 10–99 BAAR em 100 campos, ++ se 1–10 BAAR por campo em 50 campos observados e grau +++ para mais de 10 BAAR por campo em 20 campos observados, respectivamente (Brasil 2008).

As amostras clínicas incluídas no estudo faziam parte do banco de amostras estocadas a -80°C e a -20°C no Banco de Micobactérias do LPM/FM/UFMG e amostras recentes, coletadas no período do estudo. Foi selecionada uma amostra por paciente. As mostras clínicas utilizadas foram: escarro, aspirado traqueal, lavado-bronco-alveolar.

**Crítérios de exclusão:** amostras sem resultados de TS pelo MGIT 960® *kit* SIRE e amostras contaminadas.

### **Controle de qualidade**

Para controle de qualidade de cada lote usado, usamos a cepa de referência: H37Rv totalmente sensível *American Type Culture Collection* (ATCC 27294).

### **Processamento das amostras clínicas**

O preparo das amostras para a baciloscopia pelo método de ZN ou AU segue o protocolo do Manual de Recomendações para TB do MS/Brasil.

As descontaminações das amostras seguiram o protocolo de cada laboratório: no LPM/FM/UFMG foi utilizado o método N-acetil-L- cisteína (NALC), no laboratório do HJK foi utilizado o lauril sulfato de sódio como descontaminante. Após as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada.

### **Procedimento de semeadura do teste *kit* SIRE/Nitratase®PNB direto de amostras clínicas.**

Após utilização das amostras para as técnicas tradicionais e padronizadas em cada laboratório, baciloscopias e cultura convencional, e para testes adicionais como o GeneXpert®MTB/RIF, as amostras foram semeadas no *kit* SIRE/Nitratase®PNB, como descrito abaixo.

Foram transferidas 200 µL de cada amostra por meio de pipetas automáticas em todos os tubos que compõem o *kit*: três tubos controles de crescimento LJ sem fármacos, um tubo com LJ/PNB e quatro tubos com os fármacos LJ/C, totalizando oito tubos. Portanto, há necessidade de pelo menos 2,0 mL de amostra clínica descontaminada e centrifugada. Após, foram incubados a 37°C em ar ambiente.

O *kit* é composto por quatro tubos com meio LJ incorporados com fármacos de primeira linha: SIRE estreptomicina (S), isoniazida (INH), rifampicina (RIF) e etambutol (E) nas concentrações críticas de 4,0 µg/mL para S, 0,2 µg/mL para INH, 40 µg/mL para RIF e 2,0 µg/mL para E, de três tubos LJ sem fármacos para controle de crescimento e um frasco LJ contendo ácido *p*-nitrobenzoico (PNB) também foi usado, como parte de testes bioquímicos para a identificação de *M. tuberculosis*. O meio de LJ tem incorporação de KNO<sub>3</sub> na concentração de 1000 µg/mL.

O tubo de LJ com PNB é utilizado para identificação do *M. tuberculosis* por meio da inibição de crescimento de espécies do complexo do *M. tuberculosis* (CMTB) e para avaliar possíveis contaminações. (Kent & Kubica, 1985).



Figura 1: *Kit SIRE Nitratase*<sup>®</sup>PNB

### Leitura

Após 14 dias de incubação foi acrescentado 500  $\mu$ L de solução reveladora, preparada no momento do uso, (uma parte de ácido clorídrico 50% + duas partes de solução de sulfanilamida a 0,2% + duas partes de *n-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride* a 0,1%) primeiro nos tubos controle de 14 dias. Se ocorresse mudança de cor de incolor para rosa, a solução reveladora também era adicionada aos tubos com fármacos, caso contrário, os tubos com fármacos e os outros dois tubos controles continuavam incubados e repetia-se o procedimento no 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dia.

### Interpretação:

**Isolados resistentes:** não são inibidos pelo fármaco na concentração crítica, assim irão reduzir o nitrato a nitrito no tubo LJ KNO<sub>3</sub>, que é detectado pela mudança de cor, de incolor para rosa (desde rosa claro a rosa escuro) que indica o crescimento do *M. tuberculosis*.

**Isolados sensíveis:** perderão essa capacidade porque são inibidos pelo fármaco, assim não mudarão a cor da solução reveladora.

O critério de interpretação original é definido por Ängeby et al., 2002 em que o isolado clínico era considerado resistente se a mudança de cor no tubo com fármaco fosse maior ou igual ao tubo controle de crescimento diluído 1:10.

Nesse estudo foi utilizada interpretação alternativa o NRA-D. Foi considerada resistente qualquer mudança de cor observada no tubo com o fármaco após ocorrer uma cor mudança no tubo controle (sem fármaco), a cor do tubo com fármaco foi mais forte que no tubo controle para todos as amostras analisadas.

### **MGIT 960<sup>®</sup> kit SIRE**

O sistema MGIT 960<sup>®</sup> kit SIRE foi usado como método referência e os testes realizados no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) – FUNED, com vistas ao apoio diagnóstico e acompanhamento laboratorial dos casos de TB, laboratório de referência em MG.

As concentrações críticas do método são: S = 1,0 g / mL, INH = 0,1 g / mL, RIF = 1,0 g / mL, e E = 5,0 g / mL.

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os parâmetros estatísticos foram calculados por meio do *software* Testes Diagnósticos (versão 1999) Braile, DM & Godoy, MF.

As amostras selecionadas para o estudo e com resultados válidos foram os utilizados para comparação e avaliação do desempenho com o método referência MGIT 960<sup>®</sup> kit SIRE.

## Resultados

O desempenho do SIRE Nitratase®PNB em comparação com MGIT 960® kit SIRE foi avaliado em termos de sensibilidade (reflete a habilidade para detectar verdadeira resistência ao fármaco em uma amostra clínica), enquanto especificidade (reflete a capacidade para detectar verdadeira sensibilidade). Os resultados de sensibilidade e especificidade, acurácia e kappa estão desmonstrados na tabela 2.

Tabela 2: Comparação dos resultados entre o *kit* SIRE Nitratase® PNB e MGIT 960

Fármacos	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	<i>kappa</i>
RIF	99,30%	100%	99,40%	0,96
INH	98,60%	95,20%	98,10%	0,92
S	98,70%	100%	98,80%	0,88
E	99,40%	100%	99,40%	0,66

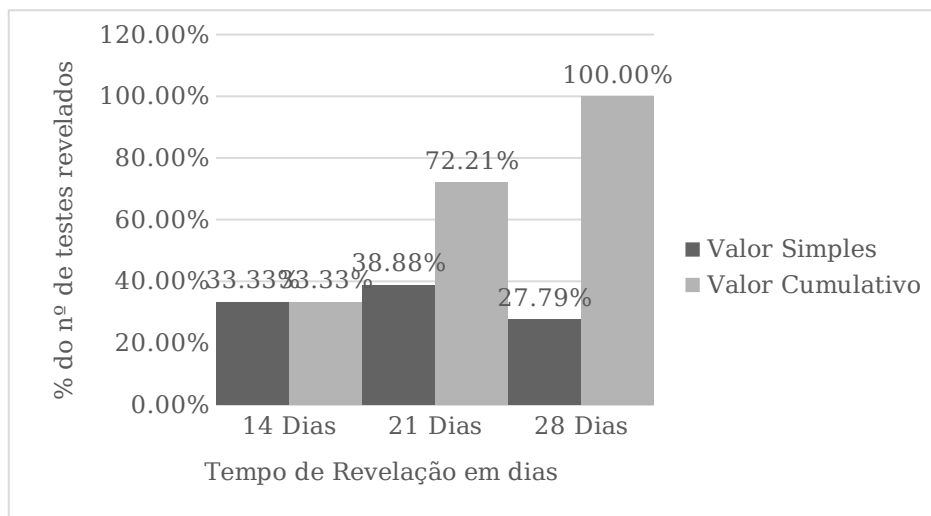
O coeficiente kappa foi o parâmetro utilizado para interpretar a concordância entre SIRE NITRATASE® PNB com o MGIT-960 *kit* SIRE de acordo com as escalas: <0,20= pobre; 0,21-0,40 = fraca; 0,41 – 0,60 = moderada; 0,61 – 0,80= boa; >0,80 = muita boa. Para os cálculos dos parâmetros estatísticos foi utilizado IC 95%. RIF= Rifamicina; INH= Isoniazida; S= Estreptomina; E=Etambutol.

Excelente concordância foi encontrada entre dois testes com valores de  $\kappa$  de 0,96, 0,92, 0,88 para RIF, INH e S e boa concordância, 0,66 para E, respectivamente. A concordância entre os métodos, foi estimada pelo coeficiente *kappa* com as seguintes escalas <0,20 = pobre; 0,21-0,40 = fraca; 0,41 – 0,60 = moderada; 0,61 – 0,80 = boa; >0,80 = muita boa ou excelente (Altmann DG, 1999).

A base do teste NRA é a redução de nitrato mensurável pela atividade metabólica das células do *M. tuberculosis*. Os bacilos ou isolados clínicos resistentes a fármacos anti-TB, podem ter menor atividade metabólica quando possuem mutações nos genes *rpoB* e *katG* que são responsáveis pela resistência da RIF e INH respectivamente, podem afetar os níveis de expressão das enzimas nitrato redutase. (Ängeby et al., 2002).

Os resultados do tempo de revelação encontram-se na tabela 3.

Tabela 3: Resultados do tempo de revelação em dias e cumulativos pelo SIRE Nitratase® PNB.



Quanto à comparação dos resultados pela baciloscopia, concentração dos bacilos, escasso, positivo e + a +++, com o tempo de revelação, os resultados encontram-se no quadro 1.

Quadro 1: número de amostras de acordo com a baciloscopia *versus* tempo de revelação.

Tempo de Revelação em dias				
Baciloscopia	14 dias	21 dias	28 dias	Total
Escasso (X/100C)	2	11	14	27
Positivo	14	16	3	33
+	5	16	11	32
++	12	13	14	39
+++	23	10	7	40
TOTAL	56	66	49	171

X: número de bacilos

## 10 DISCUSSÃO

A necessidade por métodos alternativos para o TS anti-tuberculose constitui objeto fundamental para impedir evolução inadequada da TB e disseminação do *M. tuberculosis*. Como descrito acima, os métodos genotípicos e automatizados como BACTEC™ MGIT™ 960 (Tubo Indicador de crescimento de micobactérias) (BD, Sparks, MD, EUA) têm custos elevados o que torna difícil sua aplicabilidade em países de poucos recursos (OMS 2018).

No presente estudo a concordância pela sensibilidade e especificidade para RIF e INH e entre o kit SIRE Nitratase®PNB com o MGIT 960 kit SIRE foi de (99,3% e 100%) e (98,6% e 95,2%) respectivamente, mostrando excelente acurácia e a concordância *kappa* de 0,96 para RIF e 0,92 para INH. Para S foi de 98,7% e 100% e para E de 99,4% e 100% com *kappa* de 0,88 e 0,66 respectivamente.

Os resultados foram comparáveis aos de outros estudos que utilizaram RIF e INH. Nestes estudos foram obtidas sensibilidade e especificidade do NRA-D comparado com MP como método referência, de 94% e 98%, e 100% e 98% para RIF e INH, respectivamente, e 100% de sensibilidade e especificidade de NRA para RIF (Musa et al., 2005; Affolabi et al., 2007; Visalakshi et al., 2009).

Em outro estudo realizado por (Shikama et al., 2009b) os resultados encontrados foram de 100% para INH e E e 97% para S e RIF pelo NRA-D. A concordância percentual entre os resultados de NRA e MP foi excelente para INH e RIF, ou seja, 98,3% semelhante ao presente estudo que também avaliou os quatro fármacos.

Os resultados desse estudo para RIF e INH vão de encontro à proposta da OMS para utilizar o método como triagem de TB-MDR. A precisão para a RIF é uma importante característica atrativa do NRA, à RIF é um marcador para detecção de MDR. (WHO 2011).

Em um total de 15 estudos publicados entre 2002 e 2007, o NRA-D demonstrou ter excelente especificidade de 100% para RMP e 95-100% para INH, e sensibilidades de mais de 94% e 92%, respectivamente, para esses medicamentos (Martin A et al., 2008).

O NRA-D comparou-se favoravelmente com o teste de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), o método de microtitulação de resazurina (REMA), o método de observação microscópica aos fármacos (MODS), BACTEC™ MGIT™ 960 (Tubo Indicador de crescimento de micobactérias) (BD, Sparks, MD, EUA) e Genotype® MTBDR e MTBDR*plus* (Hain Life Sciences, Nehren, Alemanha), métodos recomendados pela OMS tendo em vista a rapidez e a acurácia (Shin SS et al., 2012).

Estudo multicêntrico que avaliou o método NRA-D e NRA-I obteve alta sensibilidade e especificidade para estimar TB resistente a RIF e INH em ambos NRA-D e NRA-I. A maioria dos estudos avaliados teve uma sensibilidade de 95% ou mais, e quase todos foram 100% específicos com alto grau de precisão. O tempo de resposta do teste ficou entre 14 e 21 dias com NRA-D. (Martin A et al., 2014).

Análise do TS pelo NRA-D em ambiente com alta prevalência de TB-MDR encontrou excelente sensibilidade, especificidade e menor tempo para os resultados comparados com o MP. Para detecção de resistência de RIF foi de 99% e 100% e para INH de 94% e 100%, respectivamente (Bwanga F et al., 2011).

A menor concordância nesse estudo para o E ( $k$  de 0,66) que classicamente apresenta problemas técnicos e relatados em outros estudos. Há relatos de resultados com sensibilidade e especificidade abaixo do aceitável para S e E, Tais problemas podem ser atribuídos ao efeito bacteriostático do E e na estreita faixa que existe entre os pontos de corte dos MIC de isolados sensíveis e resistentes, perda de atividade destes fármacos quando incorporados em meio de cultivo, e aos diferentes tempos de incubação quando comparados por métodos diferentes (Ferrari ML et al., 2010).

Os resultados discrepantes desses fármacos podem ser corrigidos por ajustes na concentração crítica do fármaco nos meios em teste (Siddiqi et al. 1985). Uma possível interação entre o fármaco e o  $\text{KNO}_3$  também foi relacionado como possível causa de discrepância, resultados semelhantes foram encontrados em outros métodos que não NRA (Musa HR et al., 2005).

O método NRA-D foi implantado no Peru à nível nacional e a avaliação de custos mostrou que o valor do teste foi de aproximadamente US \$ 4,80 por amostra, valor

bem abaixo daqueles métodos que necessitam de insumos e equipamentos importados em moeda estrangeira. (Asencios L et al., 2008).

Após a implantação do NRA no Peru e sob as condições do estudo, esse teve um impacto clínico significativo nos resultados dos tratamento da TB e na sobrevivência dos pacientes, principalmente para aqueles com fatores de risco epidemiológicos, com episódio anterior de TB, contato domiciliar, diabetes mellitus, TB/HIV-AIDS, e outros ou resposta inicial insatisfatória ao tratamento. (Shin SS et al., 2012).

Nesse contexto, avaliamos o desempenho do método NRA-D para detecção rápida de resultados de TS de fármacos de primeira linha utilizando amostras de dois hospitais da cidade de Belo Horizonte, MG.

Os resultados dos TS aos fármacos de primeira linha pelo método SIRE-Nitratase<sup>®</sup>PNB estão demonstrados na tabela 2, em que 33,33% das amostras avaliadas foram reveladas no décimo quarto dia, 38,88% no vigésimo primeiro dia, que totalizou 72,21% de amostras reveladas e 27,79% no vigésimo oitavo dia, totalizando assim 100% das 180 amostras reveladas que foram demonstrados com resultados de outros estudos (Angëby KK et al., 2002; Martin, A et al., 2005; Musa, HR et al., 2005; Shin S.S et al., 2012).

A grande vantagem do NRA-D é a diminuição do tempo entre a obtenção da amostra clínica e o resultado do TS entre 10 e 18 dias. O tempo para obtenção do TS pelo NRA-D ficaram disponíveis, na maioria em 21 dias, que cumprem com os tempos de resposta que o Centros de Controle e Prevenção de Doenças para o TS de *M. tuberculosis*, esperado para um teste rápido. (Mishra B et al., 2009).

Achados semelhantes também foram observados por outros estudos (Angeby et al., 2002; Affolabi D et al., 2008; Visalakshi P et al., 2010). Esse ganho de tempo é uma vantagem adicional e muito útil para a instituição precoce da terapia apropriada.

O tempo mais rápido obtido NRA-D pode ser devido à centrifugação das amostras, concentrando mais bacilos viáveis quando comparado com o NRA-I, que utiliza isolados de cultura, que idealmente devem ser usadas de culturas recentes, em até três semanas de crescimento (Shin SS et al., 2012).

Esse tempo é semelhante aos do método MGIT 960 *kit* SIRE em que a grande desvantagem é a necessidade de insumos e equipamentos de alto custo, laboratório com infraestrutura de nível 3 (B3) e equipes técnicas qualificadas (WHO 2011).

Fármacos de segunda linha foram avaliados pelo NRA-D, o primeiro estudo fez a avaliação para a detecção de resistência à ofloxacina (OFX) e obteve resultados com completa concordância com o MP (Martin A et al., 2005).

O segundo estudo que avaliou fármacos de segunda linha, testou fármaco injetável, canamicina (CAN) que foi conduzido em Honduras juntamente com RIF e INH em contextos de alta prevalência de TB-MDR com bons resultados para RIF, INH e para OFX mas com sensibilidade menor para CAN, mais estudos sobre a crítica concentração da CAN são necessárias, segundo os autores, o método utilizado foi NRA-I (Rosales S et al., 2009).

Excelente concordância foi obtida para todos os fármacos testados em um estudo multicêntrico, em seis países diferentes, que avaliou o desempenho do NRA-D para a detecção de TB-MDR e TB-XDR. A acurácia foi de 93,7% –100% para RIF, 88,2% –100% para INH, 94,6% –100% para OFX e 100% para CAN. A maioria dos resultados da NRA-D estava disponível no dia 21º dia (Martin A et al., 2014).

Estudos com os mesmos fármacos obtiveram acurácia acima de 95% para todos os fármacos em um ambiente com altos níveis de TB-MDR e TB-XDR quando comparados com o MP e NRA-I (Ramos E et al., 2012).

Entretanto, a OMS ainda não recomenda o uso do NRA para fármacos de segunda linha dado a falta de evidências e à dificuldade inerente de padronização técnica para esses fármacos por testes colorimétricos. (WHO 2011).

Alguns pesquisadores têm proposto avaliar o NRA em meios diferentes do meio sólido LJ. O uso do meio líquido 7H9 reduziu ainda mais o tempo quando aplicado em amostras positivas de baciloscopia positivas, entretanto tem a desvantagem de biossegurança pelos riscos biológicos de manipulação do meio líquido, que exige um laboratório mais complexo nível biossegurança nível 3 (Syre H et al., 2003).

Em outra avaliação com meio líquido 7H9, em número pequeno de amostras, observou-se a necessidade de otimização adicional da técnica para reduzir o



número de culturas negativas usando escarro não diluído no tubo de controle, entretanto o desempenho geral do NRA (sensibilidade, especificidade e concordância com o método referência) foi excelente, entretanto, a técnica necessita de estudos com maior número de amostras para validação e recomendação em rotina (Affolabi D et al., 2008).

Apesar das muitas vantagens, uma possível limitação do uso de NRA é que alguns isolados de *M. tuberculosis* não reduzem o nitrato a nitrito, condição muito rara, já que <1% das espécies não possuem a enzima nitrato redutase (Kent & Kubica, 1985). Há a possibilidade de resultados positivos com micobactérias atípicas como *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. flavescens*, Complexo *M. Terra*e e outras *Mycobacterium* não tuberculosa (MNT) de crescimento rápido enquanto *M. bovis* espécie pertencente ao CMTB é negativo para nitrato (Kent & Kubica, 1985).

Com o tubo LJ/PNB que compõe o *kit* SIRE Nitratase<sup>®</sup>PNB as possíveis MNT e outros microrganismos contaminantes, fungos ou bactérias serão identificadas que impede erros de revelação por outros microrganismos que também reduzem o nitrato a nitrito.

Outra possibilidade que raramente pode ocorrer na reação de redução do nitrato a nitrito, acontece quando outros compostos podem ser reduzidos como amoníaco, nitrogênio molecular, óxido nítrico, óxido nitroso ou hidroxilamina. Neste caso não haverá mudança de cor no teste do NRA. Para confirmar a reação, adiciona-se pequena quantidade de zinco (Zn) em pó que reduzirá imediatamente o nitrato a nitrito, alterando para cor rosa, caso tenha nitrato no meio, caracterizando esta reação negativa para o *M. tuberculosis*. O processo de redução ocorre se após adição do Zn não há desenvolvimento de cor, sendo assim, não se obteve nitrito (Ängeby et al., 2002; Virtanen, 1960).

Este estudo demonstrou o alto potencial do método NRA como utilização de teste de acurácia, principalmente frente aos fármacos RIF e INH, marcadoras de resistência e as mais importantes para o tratamento da TB. Soma-se a estas vantagens a possibilidade de obtenção de resultado em tempo menor, comparável aos métodos automatizados e muito mais rápido que o MP, o único disponível na grande maioria dos países onde a TB é problema de saúde pública. Acresce a esses benefícios o seu baixo custo.

A OMS faz algumas considerações sobre a utilização do método NRA em laboratórios de micobacteriologia com poucos recursos: os reagentes não são patenteados, o que os tornam mais baratos e acessíveis, não há necessidade de equipamentos complexos ou de equipe técnica com especialistas ou altamente capacitada e sua realização é compatível com os procedimentos técnicos de biossegurança nível II, a leitura dos resultados é muito fácil e visual, pois o aparecimento da cor é imediato e permite a realização de maior número de testes ao mesmo tempo, sendo altamente promissor e aplicável (OMS 2011).

## 11 PERSPECTIVAS

- Analisar por sequenciamento do genoma completo *Whole Genome Sequencing* (WGS) os genes de resistência dos isolados testados
- Publicação dos resultados da técnica Kit SIRE/Nitratase® Plastlabor por NRA-D e MIC REMA frente aos fármacos de segunda linha
- Validar o MIC-REMA em rotina no laboratório de Micobactérias do HC/UFMG.
- Avaliação do custo médio e por atividade do Kit SIRE/Nitratase® Plastlabor direto de amostras clínicas em rotina.
- Introduzir no Laboratório de Micobactéria do HC/UFMG TS o método NRA-D, (amostras clínicas) com baciloscopia positiva.

## REFERÊNCIAS

1. Affolabi D, Odoun M, Sanoussi N, et al. Rapid and inexpensive detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* with the nitrate reductase assay using liquid medium and direct application to sputum samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008 Oct;46(10):3243-3245.
2. Altman DG. Some common problems in medical research. *Practical statistics for medical research*. 1999.
3. Andersson DI. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current opinion in microbiology*. 2003 Oct 1;6(5):452-6.
4. Ängeby, K. A., Klintz, L., & Hoffner, S. E. (2002). Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 553-555.
5. Ängeby, K. A, Juréen P, Kahlmeter G, Hoffner SE, Schön T. Challenging a dogma: antimicrobial susceptibility testing breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis*. *Bulletin of the World Health Organization*. 2012; 90:693-8.
6. Asencios, L., Yale, G., Yagui, M., Quispe, N., Taylor, A., Blaya, J., ... & Shin, S. (2008). Programmatic implementation of rapid DST for *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 12(7), 743-749.
7. Azadi D, Motallebirad T, Ghaffari K, Shojaei H. *Mycobacteriosis and tuberculosis: laboratory diagnosis*. *The open microbiology journal*. 2018; 12:41.
8. Baron EJ. The many facets of drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2013 Sep 1;35(17):135-9.
9. Bemer P, Palicova F, Rüsç-Gerdes S, Dugeon HB, Pfyffer GE. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC *Mycobacteria* Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*. 2002 Jan 1;40(1):150-4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília, DF 2008
10. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis 2a edição atualizada 2019.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Tuberculose 2021. Brasília: Ministério da Saúde; 2021 [acesso em: 6 jun.2021]. Disponível em: <https://bit.ly/3itzKhx>.
12. Brasil. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Boletim Epidemiológico. Coordenação-Geral de Vigilância das Doenças de Transmissão Respiratória de Condições Crônicas do Departamento de Doenças de Condições

Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis (CGDR/DCCI/SVS) SES-MG/SUS. Vol 52. Jun 2021.

13. Böttger EC, Springer B. Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. *European journal of pediatrics*. 2008 Feb;167(2):141-8.

14. Böttger EC. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing. *Clinical microbiology and infection*. 2011 Aug 1;17(8):1128-34.

15. Braile, D.M.; Godoy, M.F (1999). Cálculos Estatísticos Básicos para Testes Diagnósticos.

16. Bwanga, F., Haile, M., Joloba, M. L., Ochom, E., & Hoffner, S. (2011). Direct nitrate reductase assay versus microscopic observation drug susceptibility test for rapid detection of MDR-TB in Uganda. *PLoS One*, 6(5), e19565.

17. Canetti G, Fox W, Khomenko AA, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, Rist N, Šmelev NA. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bulletin of the World Health Organization*. 1969;41(1):21.

18. Carricajo, A., Fonsale, N., Vautrin, A. C., & Aubert, G. (2001). Evaluation of BacT/Alert 3D liquid culture system for recovery of mycobacteria from clinical specimens using sodium dodecyl (lauryl) sulfate-NaOH decontamination. *Journal of clinical microbiology*, 39(10), 3799-3800.

19. Castro RA, Borrell S, Gagneux S. The within-host evolution of antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2020 Dec 15.

20. CDC. [https://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/pdf/xpertmtb-rifassayfactsheet\\_final.pdf](https://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/pdf/xpertmtb-rifassayfactsheet_final.pdf) acesso em 10 02 21

21. Cegielski JP. Tuberculosis multidrogo resistente en la era final de la tuberculosis. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2018;35 :110-7.

22. A Clinician's Guide to the TB. Laboratory. Heartland National TB Center. [www.heartlandntbc.org](http://www.heartlandntbc.org) acesso em 09 11 19

23. Coban AY, Deveci A, Sunter AT, Palomino JC, Martin A. Resazurin microtiter assay for isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: updated meta-analysis. *International journal of mycobacteriology*. 2014 Dec 1;3(4):230-41.

24. Coscolla M, Gagneux S, Menardo F, Loiseau C, Ruiz-Rodriguez P, Borrell S, Otchere ID, Asante-Poku A, Asare P, Sánchez-Busó L, Gehre F. Phylogenomics of *Mycobacterium africanum* reveals a new lineage and a complex evolutionary history. *Microbial genomics*. 2021 Feb 8:000477.

25. Domínguez J, Boettger EC, Cirillo D, Cobelens F, Eisenach KD, Gagneux S, Hillemann D, Horsburgh R, Molina-Moya B, Niemann S, Tortoli E. Clinical implications of molecular drug resistance testing for Mycobacterium tuberculosis: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *The international journal of tuberculosis and lung disease*. 2016 Jan 1;20(1):24-42.
26. Dookie, N., Rambaran, S., Padayatchi, N., Mahomed, S., & Naidoo, K. (2018). Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1138-1151.
27. Drobinieski F et al. Rapid diagnostics of tuberculosis and drug resistance in the industrialized world: clinical and public health benefits and barriers to implementation. *BMC Medicine*; 2013 11:190.
28. Evangelopoulos D, da Fonseca JD, Waddell SJ. Understanding anti-tuberculosis drug efficacy: rethinking bacterial populations and how we model them. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015 Mar 1; 32: 76-80.
29. Farnia, P., Ghanavi, J., Zhavnerko, G. K., Poleschuyk, N. N., & Velayati, A. A. (2018). A review on the shape changes in pathogenic bacteria with emphasis on Mycobacterium tuberculosis. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 2(4), 242.
30. Ferrari M.L. et al. Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to first-line antimycobacterial agents in a Brazilian hospital: assessing the utility of the tetrazolium (MTT) microplate assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.105, n.5, p. 661-664. 2010.
31. Foongladda S, Roengsanthia D, Arjattanakool W, Chuchottaworn C, Chaiprasert A, Franzblau SG. Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002 Dec;6(12):1118-22. PMID: 12546122.
32. Folkvardsen DB, Thomsen VØ, Rigouts L, Rasmussen EM, Bang D, Bernaerts G, Werngren J, Toro JC, Hoffner S, Hillemann D, Svensson E. Rifampin heteroresistance in Mycobacterium tuberculosis cultures as detected by phenotypic and genotypic drug susceptibility test methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013 Dec 1;51(12):4220-2.
33. Fowler PW, Cruz AL, Hoosdally SJ, Jarrett L, Borroni E, Chiacchiaretta M, Rathod P, Walker TM, Robinson E, Peto TE, Cirillo DM. Automated detection of Mycobacterial growth on 96-well plates for rapid and accurate Tuberculosis drug susceptibility testing. *bioRxiv*. 2017 Jan 1:229427.
34. Gardee Y, Dreyer AW, Koornhof HJ, Omar SV, Da Silva P, Bhyat Z, Ismail NA. Evaluation of the GenoType MTBDRsl version 2.0 assay for second-line drug resistance detection of Mycobacterium tuberculosis isolates in South Africa. *Journal of clinical microbiology*. 2017 Mar 1;55(3):791-800.

35. Ghodousi A, Tagliani E, Karunaratne E, Niemann S, Perera J, Köser CU, Cirillo DM. Isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is a heterogeneous phenotype composed of overlapping MIC distributions with different underlying resistance mechanisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019 Jul 1;63(7).
36. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002 Feb 1;46(2):267-74.
37. Gilpin C, Korobitsyn A, Weyer K. Current tools available for the diagnosis of drug-resistant tuberculosis. *Therapeutic advances in infectious disease*. 2016 Dec;3(6):145-51.
38. Golyshevskaja VI, Korneev AA, Chernousova LN, Selina LG, Kazarova TA, Grishina TD, Safonova SG, Puzanov VA, Nikolaeva GM, Fadeeva NI. New microbiological techniques in diagnosis of tuberculosis. *Problemy tuberkuleza*. 1996 Jan 1(6):22-5.
39. Golyshevskaja VI, Irtuganova OA, Smirnova NS, Domotenko LV. Comparison of nitrate reductase and automatic BACTEC MGIT 960 AST techniques for determining the drug sensitivity of mycobacteria tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh*. 2003 Jan 1(8):34-7.
40. Gordon SV, Parish T. Microbe Profile: *Mycobacterium tuberculosis*: Humanity's deadly microbial foe. *Microbiology*. 2017 Apr 1;164(4):437-9.
41. Gumbo T. New susceptibility breakpoints for first-line antituberculosis drugs based on antimicrobial pharmacokinetic/pharmacodynamic science and population pharmacokinetic variability. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010 Apr 1;54(4):1484-91.
42. Gupta, A., & Anupurba, S. (2010). Direct drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against primary anti-TB drugs in northern India. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 4(11), 695-703.
43. Gutierrez MC, Galan JC, Blazquez J, Bouvet E, Vincent V. Molecular Markers Demonstrate that the First Described Multidrug-Resistant *Mycobacterium bovis* Outbreak Was Due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*. 1999 Apr 1;37(4):971-5.
44. Hameed HM, Islam MM, Chhotaray C, Wang C, Liu Y, Tan Y, Li X, Tan S, Delorme V, Yew WW, Liu J. Molecular targets related drug resistance mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-*Mycobacterium tuberculosis* strains. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018 Apr 10; 8:114.
45. Heysell SK, Friedland G. Epidemiology of extensively drug-resistant tuberculosis. 2018.

46. Heyckendorf, J., Andres, S., Köser, C. U., Olaru, I. D., Schön, T., Sturegård, E., ... & Merker, M. (2018). What is resistance? Impact of phenotypic versus molecular drug resistance testing on therapy for multi-and extensively drug-resistant tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(2).
47. Hoffner S. E. (2013). The role of drug susceptibility testing in M/XDR-TB. Too little and too late—Are we doing the right things? *International journal of mycobacteriology*, 2(4), 191.
48. Jaglal P., Pillay, M., & Mlisana, K. (2019). Resazurin microtitre plate assay and Sensititre® MycoTB for detection of Mycobacterium tuberculosis resistance in a high tuberculosis resistance setting. *African journal of laboratory medicine*, 8(1), 1-9.
49. Jaiswal I, Jain A, Verma SK, Singh P, Kant S, Singh M. Effect of efflux pump inhibitors on the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid. *Lung India: official organ of Indian Chest Society*. 2017 Nov;34(6):499.
50. Jones RC, Harris LG, Morgan S, Ruddy MC, Perry M, Williams R, Humphrey T, Temple M, Davies AP. Phylogenetic analysis of Mycobacterium tuberculosis strains in Wales by use of core genome multilocus sequence typing to analyze whole-genome sequencing data. *Journal of clinical microbiology*. 2019 Jun 1;57(6).
51. Kaniga K, Cirillo DM, Hoffner S, Ismail NA, Kaur D, Lounis N, Metchock B, Pfyffer GE, Venter A. 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*. 2016 Dec 1;54(12):2963-8.
52. Kassa GM, Merid MW, Muluneh AG, Fentie DT. Sputum smear grading and associated factors among bacteriologically confirmed pulmonary drug-resistant tuberculosis patients in Ethiopia. *BMC Infectious Diseases*. 2021 Dec;21(1):1-7.
53. Kent PT. *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. US department of health and human services, public health service, Centers for Disease Control; 1985
54. Khare N, Khare P, Singh D (2018) A Review: History, Structure, Diagnosis and Treatment of Tuberculosis Disease. *Mycobact Dis* 8: 263. doi:10.4172/2161-1068.1000263.
55. Koch A, Mizrahi V. Mycobacterium tuberculosis. *Trends in microbiology*. 2018 Jun 1;26(6):555-6.
56. Koch A, Cox H, Mizrahi V. Drug-resistant tuberculosis: challenges and opportunities for diagnosis and treatment. *Current Opinion in pharmacology*. 2018 Oct 1;42: 7-15.
57. Lee W Riley, MD, 2019. <https://www.uptodate.com/contents/tuberculosis-natural-history-microbiology-and-pathogenesis/print>.



58. Lempens P, Meehan CJ, Vandelannoote K, Fissette K, de Rijk P, Van Deun A, Rigouts L, de Jong BC. Isoniazid resistance levels of Mycobacterium tuberculosis can largely be predicted by high-confidence resistance-conferring mutations. *Scientific reports*. 2018 Feb 19;8(1):1-9.
59. Li J, Gao X, Luo T, Wu J, Sun G, Liu Q, Jiang Y, Zhang Y, Mei J, Gao Q. Association of gyrA/B mutations and resistance levels to fluoroquinolones in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Emerging microbes & infections*. 2014 Jan 1;3(1):1-5.
60. Maningi NE, Malinga LA, Antiabong JF, Lekalakala RM, Mbelle NM. Comparison of line probe assay to BACTEC MGIT 960 system for susceptibility testing of first and second-line anti-tuberculosis drugs in a referral laboratory in South Africa. *BMC infectious diseases*. 2017 Dec;17(1):1-8.
61. Marcel A. Behr, Sébastien Gagneux in *Genetics and Evolution of Infectious Disease in Wanger, A., Chavez, V., Huang, R., Wahed, A., Dasgupta, A., & Actor, J. K. (2017) in Microbiology and molecular diagnosis in pathology: a comprehensive review for board preparation, certification and clinical practice.*
62. Martin A, Palomino JC, Portaels F. Rapid detection of ofloxacin resistance in Mycobacterium tuberculosis by two low-cost colorimetric methods: resazurin and nitrate reductase assays. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Apr;43(4):1612-6.
63. Martin A, Portaels F, Palomino JC. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007 Feb 1;59(2):175-83.
64. Martin A, Panaiotov S, Portaels F, Hoffner S, Palomino JC, Angeby K. The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008 Jul 1;62(1):56-64.
65. Martin A, Palomino JC. Procedure Manual; Resazurin Microtiter Assay (REMA) colorimetric Redox Indicator (CRI), Drug Susceptibility Testing for Mycobacterium tuberculosis; 2009.
66. Martin A, Paasch F, Docx S, Fissette K, Imperiale B, Ribón W, González LA, Werngren J, Engström A, Skenders G, Juréen P. Multicentre laboratory validation of the colorimetric redox indicator (CRI) assay for the rapid detection of extensively drug-resistant (XDR) Mycobacterium tuberculosis. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011 Apr 1; 66(4):827-33.
67. Martin A, Imperiale B, Ravolonandriana P, Coban AY, Akgunes A, Ikram A, Satti L, Odoun M, Pandey P, Mishra M, Affolabi D. Prospective multicentre evaluation of the direct nitrate reductase assay for the rapid detection of extensively drug-resistant tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014 Feb 1;69(2):441-4.

68. Migliori GB, Matteelli A, Cirillo D, Pai M. Diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis: Current standards and challenges. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2008 Mar 1;19(2):169-72.
69. Migliori, G. B., Sotgiu, G., Rosales-Klintz, S., Centis, R., D'Ambrosio, L., Abubakar, I., and Van der Werf, M. J. (2018). ERS/ECDC Statement: European Union standards for tuberculosis care, 2017 update. *European Respiratory Journal*, 51(5).
70. Miotto P, Zhang Y, Cirillo DM, Yam WC. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. *Respirology*. 2018 Dec;23(12):1098-113.
71. Miranda SS, Almeida IN, Lopes ML, Figueiredo JD, Figueredo LJ, Kritski AL, Carvalho WD, Mansur MD. Evaluation of the Commercial Kit SIRE Nitratase for detecting resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2017 Aug;50(4):550-3.
72. Miranda, S. S. D., Almeida, I. N. D., Mansur, M. D. F. F. O., Figueredo, L. J. D. A., Carvalho, W. D. S., Hadaad, J. P. A., ... & Kritski, A. L. (2020). Detection of drug resistant *Mycobacterium Tuberculosis* strains using kit SIRE Nitratase®: a multicenter study. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 63.
73. Mishra, B., Muralidharan, S., & Srinivasa, H. (2009). Direct drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to primary anti-tubercular drugs by nitrate reductase assay. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 52(3), 343.
74. Miyata, M., Pavan, F. R., Sato, D. N., Marino, L. B., Hirata, M. H., Cardoso, R. F., ... & Leite, C. Q. F. (2013). Comparison of resazurin microtiter assay performance and BACTEC MGIT 960 in the susceptibility testing of Brazilian clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line drugs. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 281-285.
75. Müller B, Borrell S, Rose G, Gagneux S. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Genetics*. 2013 Mar 1;29(3):160-9.
76. Musa H R, Ambroggi M, Souto A, Ängeby KK. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a nitrate reductase assay applied directly on microscopy-positive sputum samples. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Jul 1;43(7):3159-61.
77. Ng KC, Supply P, Cobelens FG, Gaudin C, Gonzalez-Martin J, de Jong BC, Rigouts L. How well do routine molecular diagnostics detect rifampin heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*? *Journal of clinical microbiology*. 2019 Nov 1;57(11).

78. Ngabonziza JC, Loiseau C, Marceau M, Jouet A, Menardo F, Tzfadia O, Antoine R, Niyigena EB, Mulders W, Fissette K, Diels M. A sister lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex discovered in the African Great Lakes region. *Nat Commun.* 2020 11: 2917.
79. Neonakis, Ioannis K. et al. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *Journal of microbiological methods*, v. 75, n. 1, p. 1-11, 2008.
80. Nimmo et al., 2020 JP, Via LE, Weiner D, Blanc L, Boshoff H, Eugenin EA, Barry CE, Dartois VA. Extreme drug tolerance of *Mycobacterium tuberculosis* in caseum. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018 Feb 1;62(2).
81. Nimmo C, Brien K, Millard J, Grant AD, Padayatchi N, Pym AS, O'Donnell M, Goldstein R, Breuer J, Balloux F. Dynamics of within-host *Mycobacterium tuberculosis* diversity and heteroresistance during treatment. *EBioMedicine*. 2020 May 1;55 :102747.
82. Nonghanphithak D, Kaewprasert O, Chaichatchat P, Reechaipichitkul W, Chairprasert A, Faksri K. Whole-genome sequence analysis and comparisons between drug-resistance mutations and minimum inhibitory concentrations of *Mycobacterium tuberculosis* isolates causing M/XDR-TB. *Plos one*. 2020 Dec 31;15(12):e0244829.
83. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, Ginsberg A, Swaminathan S, Spigelman M, Getahun H, Menzies D, Raviglione M. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Oct 27;2: 16076. doi: 10.1038/nrdp.2016.76. PMID: 27784885.
84. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002 Aug 1;46(8):2720-2.
85. Palomino JC, Martin A. Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics*. 2014 Sep;3(3):317-40.
86. Parsons, LM., Somoskovi, A., Urbanczik, R., & Salfinger, M. (2004). Laboratory diagnostic aspects of drug resistant tuberculosis. *Front Biosci*, 9, 2086-2105.
87. Phelan J, Coll F, McNerney R, Ascher DB, Pires DE, Furnham N, Coeck N, Hill-Cawthorne GA, Nair MB, Mallard K, Ramsay A. *Mycobacterium tuberculosis* whole genome sequencing and protein structure modelling provides insights into anti-tuberculosis drug resistance. *BMC medicine*. 2016 Dec;14(1):1-3.
88. Pradipta IS, Forsman LD, Bruchfeld J, Hak E, Alffenaar JW. Risk factors of multidrug-resistant tuberculosis: A global systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*. 2018 Dec 1;77(6):469-78.

89. Procop GW. Laboratory diagnosis and susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections*. 2017 Jun 1;45-58.
90. Ramos E, Fissette K, de Rijk P, Palomino JC, Martin A. Integrated detection of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis using the nitrate reductase assay. *The International journal of tuberculosis and lung disease*. 2012 Jan 1;16(1):110-3.
91. Richter, E., Rüsç-Gerdes, S., & Hillemann, D. (2009). Drug-susceptibility testing in TB: current status and future prospects. *Expert review of respiratory medicine*, 3(5), 497–510.
92. Rosales S, Pineda-García L, Andino N, Almendarez N, Membreño H, Hoffner SE. Evaluation of the nitrate reductase assay for rapid detection of extensively drug-resistant tuberculosis. *The International journal of tuberculosis and lung disease*. 2009 Dec 1;13(12):1542-9.
93. Ruesen, C., Riza, A. L., Florescu, A., Chaidir, L., Editoiu, C., Aalders, N., ... & van Ingen, J. (2018). Linking minimum inhibitory concentrations to whole genome sequence-predicted drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from Romania. *Scientific reports*, 8(1), 1-8.
94. Schön T, Miotto P, Köser CU, Viveiros M, Böttger E, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017 Mar 1;23(3):154-60.
95. Schön T, Werngren J, Machado D, Borroni E, Wijkander M, Lina G, Mouton J, Matuschek E, Kahlmeter G, Giske C, Santin M. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates—the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020 Nov 1;26(11):1488-92.
96. Shenai S. WHO recommended tools to improve diagnosis of active and drug resistant tuberculosis. *Acta Medica International*. 2015 Jul 1;2(2):118
97. Shin, S. S., Asencios, L., Yagui, M., Yale, G., Suárez, C., Bayona, J., ... & Cegielski, J. P. (2012). Impact of rapid drug susceptibility testing for tuberculosis: program experience in Lima, Peru. *The International journal of tuberculosis and lung disease*, 16(11), 1538-1543
98. Shikama, M. L., Ferro e Silva, R., Villela, G., Sato, D. N., Martins, M. C., Giampaglia, C. M. S., ... & Palomino, J. C. (2009a). Multicentre study of nitrate reductase assay for rapid detection of rifampicin-resistant *M. tuberculosis*. *The International journal of tuberculosis and lung disease*, 13(3), 377-380.
99. Shikama, M. D. L., Silva, R. R. F. E., Martins, M. C., Giampaglia, C. M. S., Oliveira, R. S., Silva, R. F., ... & Palomino, J. C. (2009b). Rapid detection of resistant tuberculosis by nitrate reductase assay performed in three settings in Brazil. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 64(4), 794-796.

100. Siddiqi, S. H., Hawkins, J. E., & Laszlo, A. D. A. L. B. E. R. T. (1985). Interlaboratory drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a radiometric procedure and two conventional methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 919-923.
101. Solis LA, Shin SS, Han LL, Llanos F, Stowell M, Sloutsky A. Validation of a rapid method for detection of *M. tuberculosis* resistance to isoniazid and rifampin in Lima, Peru. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2005 Jul 1;9(7):760-4.
102. Spitaleri A, Ghodousi A, Miotto P, Cirillo DM. Whole genome sequencing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annals of translational medicine*. 2019 Sep;7(Suppl 6).
103. Syre, H., Phyu, S., Sandven, P., Bjorvatn, B., & Grewal, H. M. S. (2003). Rapid colorimetric method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin in liquid cultures. *Journal of clinical microbiology*, 41(11), 5173-5177.
104. Todar K. *Mycobacterium tuberculosis* and Tuberculosis. Online textbook of bacteriology. Madison, Wisconsin. 2008
105. Tuberculosis: Natural history, microbiology, and pathogenesis. U: UpToDate, Post TW ur. UpToDate [Internet]. Walltham, MA: UpToDate. 2018.
106. Virtanen, S. 1960. A study of nitrate reduction by mycobacteria. *Acta Tuberc. Scand. Suppl.*48:78-82.
107. Visalakshi P, Meharwal SK, Myneedu VP, Behera D. Evaluation of direct method of drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicin and isoniazid by nitrate reductase assay in a national reference laboratory. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2010 Feb 1;66(2):148-52.
108. Walzl G, McNerney R, du Plessis N, Bates M, McHugh TD, Chegou NN, Zumla A. Tuberculosis: advances and challenges in development of new diagnostics and biomarkers. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018 Jul 1;18(7):e199-210.
109. Warner DF, Mizrahi V. Tuberculosis chemotherapy: the influence of bacillary stress and damage response pathways on drug efficacy. *Clinical microbiology reviews*. 2006 Jul 1;19(3):558-70.
110. Wedajo W, Schön T, Bedru A, Kiros T, Hailu E, Mebrahtu T, Yamuah L, Ängeby K, Werngren J, Onyebujoh P, Dagne K. A 24-well plate assay for simultaneous testing of first and second line drugs against *Mycobacterium tuberculosis* in a high endemic setting. *BMC research notes*. 2014 Dec;7(1):1-8.
111. Weinstein MP, Wilson ML. Recent advances in the laboratory detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and drug resistance. *Clinical infectious diseases*. 2011 Jun 1;52(11):1350-5.

112. WHO 2008. WHO policy statement: molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis [Internet]. Geneva: WHO; 2008 [accessed 2019 May 18].
113. WHO 2011a. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis: policy statement. World Health Organization, 2011.
114. WHO 2011b. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. 2011.
115. WHO 2014. The End TB Strategy. Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. World Health Organization, 2014.
116. WHO 2015. Implementing tuberculosis diagnostics: policy framework. World Health Organization, 2015.
117. WHO 2018. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care. World Health Organization, 2018.
118. WHO 2020a. Global tuberculosis report 2020.
119. WHO 2020b. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment: drug-resistant tuberculosis treatment: online annexes.
120. WHO 2020c. WHO operational handbook on tuberculosis Rapid diagnostics for tuberculosis detection Module 3: Diagnosis Rapid diagnostics for tuberculosis detection
121. WHO 2021a. announces updated definitions of extensively drug-resistant tuberculosis. <https://www.who.int/news/item/27-01-2021-who-announces-updated-definitions-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>.
122. WHO 2021b. Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
123. Xie YL, Chakravorty S, Armstrong DT, Hall SL, Via LE, Song T, Yuan X, Mo X, Zhu H, Xu P, Gao Q. Evaluation of a rapid molecular drug-susceptibility test for tuberculosis. *New England Journal of Medicine*. 2017 Sep 14;377(11):1043-54.

124. Zhang T, Lv CF, Wang J, Zheng WB, Lu LZ, Liu SJ, Bao J. Direct tuberculosis drug susceptibility testing: time-saving and cost-effective in detecting MDR-TB. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2016 Mar 1;20(3):323-8.

125. Zheng, X., Zheng, R., Hu, Y., Werngren, J., Forsman, L. D., Mansjö, M., ... & Hoffner, S. (2016). Determination of MIC breakpoints for second-line drugs associated with clinical outcomes in multidrug-resistant tuberculosis treatment in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(8), 4786-4792.

#### **ANEXOS**

**ANEXO 1: Comprovante de submissão do “Short Communication” à revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**

28/04/2021

ScholarOne Manuscripts

 Memórias do Instituto Oswaldo Cruz[Home](#)[Author](#)[Review](#)

## Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

**Submitted to**

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

**Manuscript ID**

MIOC-2021-0153

**Title**Comparison of the Minimum Inhibitory Concentrations for *Mycobacterium tuberculosis* by REMA to the MGIT-960® SIRE kit, GenoType® MTBDRplus, and GeneXpert® MTB/RIF**Authors**

Mansur, Maria

Assis, Lida

Almeida, Isabela

Soares, Valéria

Augusto, Cláudio

Leal, Eilda

Haddad, João Paulo

Carvalho, Wânia

Spindola de Miranda, Silvana

**Date Submitted**

28-Apr-2021

[Author Dashboard](#)



**ANEXO 2: Parecer Consubstanciado do CEP/UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AÇÕES INOVADORAS PARA AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE E TUBERCULOSE RÉSISTENTE

**Pesquisador:** SILVANA SPINDOLA DE MIRANDA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 95206318.3.0000.5149

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.945.434

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de apreciação de resposta à diligência de estudo experimental a ser realizado com amostras clínicas, provenientes do Banco de Micobactérias LPM/FM/UFMG que serão coletadas no período de 2018 a 2023 e que serão estocadas a -80°C. Essas amostras serão provenientes dos pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG) e do Hospital Júlia Kubitschek. Os testes fenotípicos serão realizados no LPM/FM/UFMG e os testes moleculares serão desenvolvidos no Laboratório de Saúde Pública e Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os pacientes do Complexo Hospitalar do HC/UFMG bem como do HJK serão convidados a participar o estudo e responder o questionário clínico/epidemiológico. Os prontuários dos pacientes serão consultados para complementação dos dados. Será solicitada aos participantes a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os Critérios de inclusão da pesquisa são:

Amostras clínicas com suspeita de tuberculose. Os Critérios de exclusão são: Pacientes que não responderem ao questionário clínico e não assinarem o TCLE. Serão utilizados métodos moleculares para extração do DNA e de detecção/identificação de micobactérias. Será realizado o Teste de Sensibilidade: o procedimento é realizado após ressuspender as amostras descontaminadas em 4,0 mL de água destilada, e inocular 200l dessa suspensão nos tubos controle e contendo fármacos. A inoculação das amostras será realizada de acordo com as instruções do fabricante (Kit

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 2.945.434

SIRE Nitratase® 2014, Plastlabor®). Resumidamente, as amostras serão inoculadas em cada tubo de LJ contendo nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) e os respectivos fármacos com as seguintes concentrações críticas: 4g/ml de Streptomina, 0,2 g/ml de Isoniazida, 40 g/ml de Rifampicina e 20 g/ml de Etambutol, 200l do inoculo não diluído será inoculado. Em três tubos com meio de LJ+KNO<sub>3</sub> sem adição de fármacos será inoculado 200l da mesma amostra para o controle de crescimento, assim como em três tubos contendo o meio de LJ+KNO<sub>3</sub> com adição do ácido p-nitrobenzóico (PNB) para o controle de contaminação por Micobactérias Não Tuberculosas (MNT). A pesquisa tem como perspectiva: Esses novos métodos diagnósticos para o diagnóstico laboratorial da tuberculose e da tuberculose resistente poderão ser aplicáveis utilizando amostras clínicas na rotina dos laboratórios do Sistema Único de Saúde.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Foram descritos:

Objetivo Primário: Avaliar métodos laboratoriais para identificação e teste de sensibilidade do M. tuberculosis diretamente em amostras clínicas e correlacionar com dados clínicos e epidemiológicos.

Objetivos Secundários: • Padronizar o teste de sensibilidade meio da técnica Nitrate Reductase Assay (NRA) diretamente em amostras clínicas

• Padronizar métodos de extração de DNA de micobactérias “in house” e comerciais diretamente em amostra clínica

• Padronizar métodos moleculares de detecção de Micobactérias “in house” e comerciais diretamente em amostra clínica

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os pesquisadores declaram:

Riscos: Algumas das questões que constam nos questionários são inapropriadas e pode produzir o paciente a algum sentimento indesejável, como por exemplo: não gostar da lembrança de algum sintoma da doença ou não sentir a vontade para responder alguma questão, mas caso o paciente ache necessário, poderá interromper a entrevista a qualquer momento. Benefícios: Este estudo é importante para se compreender melhor as doenças causadas pelas Micobactérias que não causam tuberculose, para auxiliar no desenvolvimento de diagnóstico dessas micobactérias e se elas são sensíveis ou resistentes aos fármacos. No entanto, não há benefícios diretos aos participantes da pesquisa.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II

**CEP:** 31.270-901

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.945.434

O projeto de pesquisa busca fornecer informações sobre a utilização de um kit comercial Sire Nitrata-se visando o diagnóstico laboratorial de tuberculose e tuberculose resistente. Trata-se de um teste produzido por indústria brasileira. Os resultados obtidos poderão fornecer uma opção para utilização na rotina dos laboratórios do Sistema Único de Saúde. Foram realizadas todas as adequações no projeto e TCLE, bem como inserido o Termo de constituição de biorrepositório.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados:

- Folha de rosto preenchida e assinada.
- Parecer aprovado da Câmara do Departamento de Clínica Médica, após atendidas todas as adequações sugeridas pelo parecerista.
- Declaração da coordenadora do SEDT de Pneumologia e Cirurgia Torácica autorizado a realização da pesquisa
- Projeto no formato da Plataforma Brasil e detalhado.
- Declaração da Gerência de Ensino e Pesquisa (GEPE) do HC/UFMG de registro e avaliação do projeto.
- Anuência da Rede FHEMIG - Hospital Júlia Kubitschek para a realização da pesquisa em suas dependências.
- TCLE apresentado como carta convite, assegurando o anonimato, e a desistência a qualquer momento do projeto, sem qualquer prejuízo. Foram atendidas todas as pendências no TCLE.
- Carta resposta ao COEP
- Termo de constituição de biorrepositório
- Formulário de pesquisa da Plataforma Brasil em formato PDF
- Novo TCLE com as devidas adequações

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sou, SMJ deste Comitê, pela aprovação do projeto.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II

**CEP:** 31.270-901

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.945.434

notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1179607.pdf	10/09/2018 14:22:18		Aceite
Outros	Termo_biorrepositorio_acoes_inovadoras_30_08_18.pdf	10/09/2018 14:21:40	SILVANA SPINDOLA DE MIRANDA	Aceite
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Formulario_de_pesquisa_plataforma_brasil_testeamostras_24_08_18.pdf	24/08/2018 14:29:13	SILVANA SPINDOLA DE MIRANDA	Aceite
Outros	Resposta_CEP_acoes_inovadoras_24_08_2018.pdf	24/08/2018 14:27:16	SILVANA SPINDOLA DE MIRANDA	Aceite
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_testeamostras_24_08_18.pdf	24/08/2018 14:25:30	SILVANA SPINDOLA DE MIRANDA	Aceite
Outros	Declaracao_HC_Acoes_Inovadoras.pdf	31/07/2018 16:18:11	SILVANA SPINDOLA DE MIRANDA	Aceite
Outros	Parecer_HC_Acoes_inovadoras_Servico_pnumologia_30_07_18.pdf	31/07/2018 16:12:18	SILVANA SPINDOLA DE MIRANDA	Aceite
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Acoes_Inovadoras_30_07_18.pdf	31/07/2018 16:09:04	SILVANA SPINDOLA DE MIRANDA	Aceite
Outros	Parecer_DCLM_total.pdf	13/07/2018 11:09:09	SILVANA SPINDOLA DE MIRANDA	Aceite
Outros	Parecer_HJK_Acoes_inovadoras.pdf	13/07/2018 10:59:18	SILVANA SPINDOLA DE MIRANDA	Aceite
Outros	Parecer_Ambulatorio_BiasFortes_HC.pdf	13/07/2018 10:57:17	SILVANA SPINDOLA DE MIRANDA	Aceite
Outros	Questionario_Clinico_13_02_18.pdf	13/07/2018 10:52:11	SILVANA SPINDOLA DE MIRANDA	Aceite

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.945.434

BELO HORIZONTE, 05 de Outubro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Eliane Cristina de Freitas Rocha**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br