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

FILIPE AUGUSTO COIMBRA DE ARAÚJO

AVALIAÇÃO DO USO DE FATORES DE RESSUSCITAÇÃO NO SISTEMA BACTEC MGIT 960 PARA DETECÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis* EM AMOSTRAS PAUCIBACILARES

VITÓRIA – ES
2024

FILIPE AUGUSTO COIMBRA DE ARAÚJO

AVALIAÇÃO DO USO DE FATORES DE RESSUSCITAÇÃO NO SISTEMA BACTEC MGIT 960 PARA DETECÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis* EM AMOSTRAS PAUCIBACILARES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para a obtenção do grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Moisés Palaci

VITÓRIA – ES

2024

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

Araújo, Filipe Augusto Coimbra de, 1999-
A658a Avaliação do uso de fatores de ressuscitação no sistema BACTEC MGIT 960 para a detecção de Mycobacterium tuberculosis em amostras paucibacilares / Filipe Augusto Coimbra de Araújo. - 2024.
(recurso não paginado). : il.

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

1. Mycobacterium tuberculosis. 2. Tuberculose. 3. Bacteriologia - Cultura e meios de cultura. 4. Tuberculose - Diagnóstico. I. Palaci, Moisés. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

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

Ata da sessão de defesa de dissertação do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas (PPGDI) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, do discente Filipe Augusto Coimbra de Araujo, candidato(a) ao título de Mestre(a) em Doenças Infecciosas, realizada às 14:00h do dia vinte e quatro de outubro de dois mil e vinte e quatro, no auditório Rosa Maria Costa Rego Paranho. O presidente da Banca, Prof. Dr. Moises Palaci, apresentou os demais membros da comissão examinadora, constituída pelos Doutores, Lucilaine Ferrazoli (Instituto Adolfo Lutz), Sarah Gonçalves Tavares (UFES). Em seguida, cedeu a palavra ao candidato que em 40 minutos apresentou sua dissertação intitulada "Avaliação do uso de fatores de ressuscitação no sistema BACTEC MGIT 960 para a detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras paucibacilares". Terminada a apresentação do aluno, o presidente retomou a palavra e a cedeu aos membros da Comissão Examinadora, um a um, para procederem à arguição. O presidente convidou a Comissão Examinadora a se reunir em separado para deliberação. Ao final, a Comissão Examinadora retornou e o presidente informou aos presentes que a dissertação havia sido APROVADA e que o(a) discente(a) deve providenciar dentro do período de um mês a versão final. O Presidente, então, deu por encerrada a sessão, e eu, Perlyson Pires de Carvalho, Secretário do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, lavrei a presente ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Vitória, 24 de outubro de 2024

.

Prof. Dr. Moises Palaci
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Profa. Dra. Lucilaine Ferrazoli
Instituto Adolfo Lutz – Titular Externo

Profa. Dra. Sarah Gonçalves Tavares
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno

Vitória, 24 de outubro de 2024.

Centro de Ciências da Saúde – Av. Marechal Campos, 1468 - Bonfim, Vitória - ES | CEP 29047-105 Tel: (27) 3335-7259 | www.doencasinfecciosas.ufes.br | ppgdi.ufes@gmail.com

Documento assinado digitalmente conforme descrito no(s) Protocolo(s) de Assinatura constante(s) neste arquivo, de onde é possível verificar a autenticidade do mesmo.

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

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

O(a) mestrando(a) Filipe Augusto Coimbra de Araujo apresentou a dissertação intitulada "Avaliação do uso de fatores de ressuscitação no sistema BACTEC MGIT 960 para a detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras paucibacilares" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (X) aprovar ( ) reprovar a dissertação habilitando Filipe Augusto Coimbra de Araujo a obter o Grau de Mestre(a) em Doenças Infecciosas.

Vitória, 24 de outubro de 2024.

Prof. Dr. Moises Palaci
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Profa. Dra. Lucilaine Ferrazoli
Instituto Adolfo Lutz – Titular Externo

Profa. Dra. Sarah Gonçalves Tavares
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno

Documento assinado digitalmente conforme descrito no(s) Protocolo(s) de Assinatura constante(s) neste arquivo, de onde é possível verificar a autenticidade do mesmo.

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

REGISTRO DE JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DO CANDIDATO AO GRAU DE MESTRE PELO PPGDI/UFES.

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado intitulada "Avaliação do uso de fatores de ressuscitação no sistema BACTEC MGIT 960 para a detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras paucibacilares" elaborada por Filipe Augusto Coimbra de Araujo, candidato(a) ao Grau de Mestre em Doenças Infecciosas, recomendou, após apresentação da Dissertação, realizada no dia 24 de outubro de 2024, que a mesma seja (assinale um dos itens abaixo):

(X) Aprovada

( ) Reprovada

Os membros da Comissão deverão indicar a natureza de sua decisão através de sua assinatura na coluna apropriada que segue:

Aprovada	Reprovada
---	---

Centro de Ciências da Saúde – Av. Marechal Campos, 1468 - Bonfim, Vitória - ES | CEP 29047-105 Tel: (27) 3335-7259 | www.doencasinfecciosas.ufes.br | ppgdi.ufes@gmail.com

Documento assinado digitalmente conforme descrito no(s) Protocolo(s) de Assinatura constante(s) neste arquivo, de onde é possível verificar a autenticidade do mesmo.

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

--- ---

--- ---

--- ---

--- ---

--- ---

Prof. Dr. Moises Palaci
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Profa. Dra. Lucilaine Ferrazoli
Instituto Adolfo Lutz – Titular Externo

Profa. Dra. Sarah Gonçalves Tavares
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno

Documento assinado digitalmente conforme descrito no(s) Protocolo(s) de Assinatura constante(s) neste arquivo, de onde é possível verificar a autenticidade do mesmo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA

O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
MOISES PALACI - SIAPE 1487447
Departamento de Patologia - DPA/CCS
Em 29/10/2024 às 10:41

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link: https://api-lepisma.prod.uks.ufes.br/arquivos-assinados/1020489?tipoArquivo=O

Documento assinado digitalmente conforme descrito no(s) Protocolo(s) de Assinatura constante(s) neste arquivo, de onde é possível verificar a autenticidade do mesmo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA

O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
SARAH GONCALVES TAVARES - SIAPE 2277189
Departamento de Patologia - DPA/CCS
Em 30/10/2024 às 15:53

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link: https://api-lepisma.prod.uks.ufes.br/arquivos-assinados/1022169?tipoArquivo=O

gov.br Documento assinado digitalmente
LUCILAINE FERRAZOLI
Data: 30/10/2024 18:27:13-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Documento assinado digitalmente conforme descrito no(s) Protocolo(s) de Assinatura constante(s) neste arquivo, de onde é possível verificar a autenticidade do mesmo.

À minha mãe, Magna, por sempre ser a primeira a acreditar em mim e por seu amor infinito.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus caminhos e prover o sustento necessário. Por me ensinar todos os dias que Ele tem o melhor para mim e por manter minha fé.

Aos meus pais, Magna e Sérgio, por todo o amor que sempre tiveram comigo, por cuidarem de mim e pelo incentivo à educação. Por sempre me lembrarem que sou um vencedor, pelo apoio nos momentos difíceis e por nunca me deixarem desistir.

À minha tia, Gislene, pelo imenso carinho, por me tratar como um filho. Por todos os conselhos, por toda a ajuda e por ter aberto as portas de sua casa quando eu precisei.

A Aresko, pelo companheirismo e tempo de qualidade. Por sempre me ouvir quando eu preciso, por me ajudar a encarar as dificuldades, pela confiança e por todo o apoio.

A Luiz e Manu, por terem me guiado no laboratório e pelo conhecimento compartilhado comigo. Por muitas vezes pararem tudo para me ajudar e pela imensa contribuição para essa pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Moisés Palaci, pelos ensinamentos, por acreditar no meu potencial e por me dar a oportunidade de conduzir este estudo.

Aos meus colegas do Núcleo de Doenças Infecciosas, João, Leduc, Canal e Reginaldo, pelas conversas descontraídas, pelos cafés queimados e por me ajudarem com a separação e transporte das amostras, tornando possível a realização deste estudo.

A Fabíola e aos colaboradores do Laboratório de Micobacteriologia do LACEN-ES, pela separação e fornecimento de parte das amostras utilizadas na pesquisa.

À Universidade Federal do Espírito Santo, por ser minha segunda casa durante os últimos sete anos, pelas amizades incríveis que fiz nesse tempo e pela educação de qualidade.

Por fim, à FAPES, pela concessão da bolsa de estudos, possibilitando minha adesão e permanência no mestrado, bem como o fomento para o desenvolvimento desta pesquisa.

“Muitos propósitos há no coração do homem,
mas o conselho do Senhor permanecerá.

Provérbios 19:21

RESUMO

A dormência de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) dificulta o diagnóstico laboratorial, uma vez que as subpopulações dormentes não são facilmente detectadas pelos métodos convencionais. O objetivo deste estudo foi avaliar o uso de filtrado de cultura (FC) no sistema BACTEC MGIT 960 para melhorar a detecção de Mtb em 245 amostras clínicas paucibacilares de pacientes com suspeita de tuberculose (TB). O estudo comparou amostras inoculadas em meio MGIT com e sem a adição de FC de Mtb. Os resultados mostraram que a adição do FC aumentou a sensibilidade do teste, especialmente em amostras extrapulmonares, com sensibilidade e especificidade do MGIT+FC de 97,50% e 97,86%, respectivamente. Em comparação, o Xpert MTB/RIF Ultra apresentou sensibilidade de 60,53% e especificidade de 93,97%, enquanto o meio à base de ovo mostrou 40% de sensibilidade e 91% de especificidade. Além disso, o uso de FC aumentou a frequência de contaminação das culturas líquidas e não alterou o tempo de positivação do MGIT. Esses achados sugerem que o uso de FC pode ser uma ferramenta promissora para aumentar a precisão do diagnóstico de TB em amostras com baixa carga bacteriana.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculose, Dormência, Filtrado de Cultura, BACTEC MGIT.

ABSTRACT

The dormancy of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) challenges laboratory diagnosis, as dormant subpopulations are not easily detected by conventional methods. The objective of this study was to evaluate the use of culture filtrate (CF) in the BACTEC MGIT 960 system to improve the detection of Mtb in 245 paucibacillary clinical samples from patients suspected of having tuberculosis (TB). The study compared samples inoculated in MGIT medium with and without the addition of Mtb CF. The results showed that the addition of CF increased the sensitivity of the test, particularly in extrapulmonary samples, with sensitivity and specificity for MGIT+CF being 97.50% and 97.86%, respectively. In comparison, the Xpert MTB/RIF Ultra presented a sensitivity of 60.53% and a specificity of 93.97%, while the egg-based medium showed 40% sensitivity and 91% specificity. Furthermore, the use of CF increased the frequency of contamination in liquid cultures and did not alter the time to positivity of MGIT. These findings suggest that the use of CF may be a promising tool for enhancing the accuracy of TB diagnosis in samples with low bacterial load.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis, Dormancy, Culture Filtrate, BACTEC MGIT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferentes subpopulações de MTB em uma amostra de escarro de paciente com tuberculose pulmonar.....32

Figura 2 – Microplaca de 48 poços do controle microbiológico do filtrado de cultura.46

Figura 3 – Taxas de positivação dos testes diagnósticos em diferentes espécimes clínicos.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado do controle microbiológico do filtrado de cultura.....47

Tabela 2 – Distribuição quantitativa dos espécimes clínicos analisados.....47

Tabela 3 – Análise de concordância entre MGIT+FC e MGIT na detecção de micobactérias.....49

Tabela 4 – Caracterização das amostras discordantes entre MGIT+FC e MGIT na detecção de micobactérias.....49

Tabela 5 – Desempenho do MGIT+FC em relação ao MGIT para detecção de micobactérias.....50

Tabela 6 – Comparação dos resultados entre os testes Xpert MTB/RIF Ultra e MGIT+FC.....51

Tabela 7 – Comparação dos resultados entre os testes Xpert MTB/RIF Ultra e MGIT.....52

Tabela 8 – Comparação das métricas de desempenho entre os testes Xpert MTB/RIF Ultra, cultura em meio à base de ovo e baciloscopia.....52

Tabela 9 – Análise do tempo de positivação dos testes MGIT+FC e MGIT.....53

Tabela 10 – Identificação das micobactérias encontradas nos espécimes clínicos.....53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR – Bacilos Álcool-Ácido Resistentes

cAMP – Adenosina Monofosfato Cíclico (do inglês *Cyclic Adenosine Monophosphate*)

DO – Densidade Ótica

FC – Filtrado de Cultura

FR – Fatores de Ressuscitação (do inglês *Resuscitation-Promoting Factors*)

IGRA – Ensaios de Liberação de Interferon-Gama (do inglês *Interferon-Gamma Release Assay*)

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

MGIT – Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*)

MNT – Micobactéria Não Tuberculosa

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

NALC – N-Acetil-L-Cisteína (do inglês *N-Acetyl-L-Cysteine*)

NaOH – Hidróxido de Sódio

NDI – Núcleo de Doenças Infecciosas

NO – Óxido Nítrico

OADC – Ácido Oleico-Albumina-Dextrose-Catalase (do inglês *Oleic Acid-Albumin-Dextrose-Catalase*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

PNB – Ácido Paranitrobenzoico (do inglês *Para-Nitrobenzoic Acid*)

RPF – Fatores Promotores de Ressuscitação (do inglês *Resuscitation-Promoting Factors*)

RVN – Razão de Verossimilhança Negativa

RVP – Razão de Verossimilhança Positiva

TB – Tuberculose

TEP – Tuberculose Extrapulmonar

TST – Teste Tuberculínico (do inglês *Tuberculin Skin Test*)

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

ZN – *Ziehl-Neelsen*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. REVISÃO DE LITERATURA 15
2.1 TUBERCULOSE 15
2.2 EPIDEMIOLOGIA 16
2.3 AGENTE ETIOLÓGICO 17
2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL .....,..18
2.4.1 Baciloscopia 18
2.4.2 Cultura bacteriana 19
2.4.3 Xpert® MTB/RIF Ultra 20
2.5 DORMÊNCIA 21
2.5.1 Terminologia 21
2.5.2 Estado de dormência 22
2.5.3 Possíveis implicações na terapêutica e transmissão 22
2.5.4 Ressuscitação 23
2.6 JUSTIFICATIVA 25
3. OBJETIVOS 27
3.1 OBJETIVO GERAL 27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 27
4. MATERIAL E MÉTODOS 28
4.1 ESTRATÉGIA DO ESTUDO 28
4.1.1 Delineamento 28
4.1.2 Local 28
4.1.3 Desenho 28
4.2 ESPÉCIMES CLÍNICOS.....28
4.2.1 Critérios de inclusão 29
4.2.2 Critérios de exclusão 29
4.3 PRODUÇÃO DO FILTRADO DE CULTURA DE MTB 29
4.3.1 Pré-cultura 29
4.3.2 Cultura 30
4.3.3 Filtração da cultura 30

4.3.4 Liofilização 31
4.3.5 Armazenamento.....31
4.3.6 Controle de qualidade 31
4.4 EXAMES LABORATORIAIS 32
4.4.1 Classificação dos espécimes clínicos 32
4.4.2 Processamento dos espécimes clínicos não-estéreis 32
4.4.3 Processamento dos espécimes clínicos estéreis 33
4.4.4 Baciloscopia 33
4.4.5 Gene Xpert MTB/RIF Ultra 34
4.4.6 Cultura em meio sólido à base de ovo 35
4.4.7 Cultura em sistema BD BACTEC MGIT 35
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 37
4.6 ASPECTOS ÉTICOS 38

5. RESULTADOS 39

6. DISCUSSÃO 47

7. CONCLUSÃO 54

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 55

1. INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que apresenta prevalência relevante em países com menor desenvolvimento socioeconômico (HOUBEN; DODD, 2016; WHO, 2023). Em 2022, cerca de 7,5 milhões de pessoas foram diagnosticadas com TB em todo o mundo, o que representa o maior número de novos casos da doença registrado desde o início do monitoramento pela OMS (OMS, 2023).

A TB é causada por micobactérias da espécie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e caracterizada por inflamação granulomatosa necrosante em 85% dos casos (BAÑULS et al., 2015; DHEDA; BARRY; MAARTENS, 2015). Afeta predominantemente os pulmões, mas também pode causar infecções extrapulmonares, especialmente em órgãos com alta concentração de oxigênio (KAUFMANN, 2001). Os sintomas de sua forma pulmonar incluem tosse, febre, sudorese noturna, perda de peso, hemoptise, dor no peito e dispneia (CURVO-SEMEDO; TEIXEIRA; CASEIRO-ALVES, 2005; PAI et al., 2016).

Qualquer órgão pode ser afetado pela TB, mas as formas pulmonares têm recebido mais atenção devido ao seu papel na propagação da doença e à sua frequência. Porém, as formas extrapulmonares, cujo diagnóstico é mais difícil, estão despertando interesse devido a um aumento de sua frequência relativa (PRAKASHA et al., 2013). A TB extrapulmonar (TEP) compreende um grupo de patologias muito diversas, sendo as formas ganglionares e pleurais as mais frequentes, seguidas pelas formas osteoarticulares e urogenitais (FISKE et al., 2010). Os fatores de risco conhecidos para TB (imunodepressão, diabetes, desnutrição, etc.) são comuns às formas pulmonares e extrapulmonares da doença, com exceção do alcoolismo, que não parece aumentar o risco de TEP (YANG et al., 2004).

O tratamento da TB no Brasil é padronizado e dividido em duas etapas: a fase intensiva e a fase de manutenção. Durante a fase intensiva, que dura quatro meses, os pacientes recebem diariamente Rifampicina, Isoniazida, Etambutol e Pirazinamida por via oral. Já na fase de manutenção, que se estende por mais dois meses, são administradas apenas Rifampicina e Isoniazida, podendo haver extensão do tratamento de acordo com a resposta do paciente. Esse esquema é indicado para novos casos que sejam sensíveis aos medicamentos de primeira linha (BRASIL, 2019; WHO, 2010). Além disso, o Ministério da Saúde recomenda o uso de Rifampicina ou Isoniazida em casos de infecção latente por Mtb (BRASIL, 2019).

Embora várias ferramentas tenham sido desenvolvidas para a detecção do bacilo, o diagnóstico laboratorial convencional ainda se baseia na baciloscopia e na cultura de micobactérias em meios líquidos e sólidos a partir de amostras representativas do local da infecção. Os meios de cultura sólidos, como Ogawa-Kudoh e Löwenstein-Jensen, à base de ovo, são amplamente utilizados devido ao baixo custo e ao baixo índice de contaminação, embora o tempo necessário para a detecção varie de duas a oito semanas devido ao crescimento lento de Mtb (BRASIL, 2008). O meio de cultura líquido pode ser utilizado em métodos automatizados, como o Sistema BD BACTEC™ MGIT™ (Mycobacteria Growth Indicator Tube), e apresenta maior sensibilidade na detecção de baixas cargas bacterianas no espécime clínico em comparação com os meios sólidos (NAMBIAR et al., 2017). A cultura MGIT também se mostra eficiente para o isolamento de Mtb em espécimes extrapulmonares devido à natureza paucibacilar desses espécimes (NOUSSAIR et al., 2009).

Em contrapartida, a dormência de Mtb, que é uma resposta adaptativa às condições ambientais adversas ou à resposta imunológica do hospedeiro, resulta em populações bacterianas capazes de sobreviver por longos períodos de tempo em estado não-replicativo. Essas populações apresentam características fisiológicas distintas, como funções metabólicas reduzidas e perda da resistência ao álcool-ácido, o que dificulta sua detecção nos exames laboratoriais (FLYNN; CHAN, 2001), comprometendo assim o diagnóstico do paciente (LENAERTS; DARTOIS, 2015).

A detecção dessas subpopulações dormentes é desafiadora para os métodos microbiológicos convencionais, que dependem do estado metabólico ativo dos microrganismos para crescimento em meio de cultura e subsequente identificação. Essa resistência natural às condições adversas do ambiente hospedeiro não apenas influencia a patogênese da TB, mas também representa um obstáculo significativo para estratégias terapêuticas que visam a erradicação completa de Mtb (CHENGALROYEN, 2016; MUKAMOLOVA, 2010).

Portanto, é fundamental que se avalie a incorporação de fatores de ressuscitação em exames de cultura para que se possa detectar as diferentes populações de Mtb nos espécimes clínicos, a fim de otimizar o diagnóstico de pacientes suspeitos de TB.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por micobactérias da espécie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), reconhecida como um problema de saúde pública mundial. Considerada a segunda maior causa de morte por um único agente infeccioso, atrás somente da COVID-19, a TB predomina em países com menor desenvolvimento socioeconômico, com estimativas sugerindo que um quarto da população mundial esteja infectada pelo bacilo causador da doença (HOUBEN; DODD, 2016; WHO, 2023).

A forma ativa da doença caracteriza-se pela multiplicação da bactéria e pela invasão de regiões específicas do organismo, sendo que indivíduos com a doença ativa apresentam sintomas como fraqueza, perda de peso, febre, anorexia, calafrios, sudorese noturna, tosse, dor torácica e hemoptise (GETAHUN, 2015; DHEDA; BARRY; MAARTENS, 2015). Embora qualquer órgão possa ser afetado, as formas pulmonares têm recebido mais atenção devido ao seu papel na propagação da doença, representando mais da metade das localizações tuberculosas. Já as formas extrapulmonares, cujo diagnóstico é mais desafiador, estão ganhando destaque devido ao aumento de sua frequência relativa (PRAKASHA et al., 2013). A TB extrapulmonar (TEP) abrange patologias diversas, sendo as formas ganglionares e pleurais as mais comuns, seguidas das osteoarticulares e urogenitais (FISKE et al., 2010). Fatores de risco como imunodepressão, diabetes e desnutrição são comuns a ambas as formas da doença, exceto o alcoolismo, que não parece aumentar o risco de TEP (YANG et al., 2004).

A transmissão da TB ocorre principalmente por partículas expelidas durante tosse, espirro e fala de indivíduos com TB pulmonar. Estas partículas, conhecidas como núcleos de Wells, contêm 1 a 2 bacilos capazes de alcançar os bronquíolos e alvéolos de indivíduos suscetíveis. Mais de 90% dos casos resultam em infecção latente assintomática, com cerca de 5% de risco de evolução para doença ativa nos primeiros 18 meses e 5% ao longo da vida (ZUMLA et al., 2013).

A infecção latente é caracterizada pela presença de Mtb no organismo, mas sob controle do sistema imunológico. Indivíduos com infecção latente não apresentam sinais clínicos visíveis, não transmitem o Mtb e correm o risco de desenvolver a doença se não receberem tratamento eficaz (GETAHUN, 2015; DHEDA; BARRY;

MAARTENS, 2015). A complexidade da infecção por Mtb é amplamente influenciada pela heterogeneidade populacional e pelo espectro de estágios metabólicos, incluindo a infecção latente (DARTOIS, 2022). Essa latência é associada à presença de populações bacterianas dormentes e não replicantes, que possuem características citológicas e fisiológicas adaptativas resultantes da resposta do sistema imunológico do hospedeiro (BATYRSHINA; SCHWARTZ, 2019; NUERMBERGER; BISHAI; GROSSET, 2004).

Atualmente, a infecção latente é diagnosticada por meio do teste tuberculínico (TST) e do ensaio de liberação de interferon-gama (IGRA) (CARRANZA et al., 2020). O TST avalia a reação imunológica a proteínas de Mtb, enquanto o IGRA mede a liberação de IFN-γ por linfócitos sensibilizados em resposta a antígenos específicos, na ausência de manifestações clínicas ou evidências radiológicas. No entanto, nem o TST nem o IGRA diferenciam com precisão entre infecção latente e ativa, nem entre reativação e reinfecção (CARRANZA et al., 2020). Ambos os testes apresentam sensibilidade reduzida em pacientes imunocomprometidos e baixo valor preditivo para a progressão para TB ativa (PAI et al., 2014).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Desde 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e os países membros da Organização das Nações Unidas (ONU) se comprometeram a erradicar a epidemia de TB, adotando a Estratégia para o Fim da TB e os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Esta estratégia busca reduzir principalmente os casos de morte por TB, a taxa de incidência de TB e o percentual de domicílios enfrentando custos elevados devido à doença. No entanto, as metas globais estabelecidas na primeira reunião de alto nível da ONU sobre TB, para o período de 2018 a 2022, não foram alcançadas (WHO, 2023).

Em 2022, cerca de 7,5 milhões de pessoas foram diagnosticadas com TB em todo o mundo, o que representa o maior número de novos casos da doença registrados desde o monitoramento pela OMS (OMS, 2023). Este aumento significativo pode ser atribuído, em parte, à dificuldade de acesso ao diagnóstico durante os anos anteriores à pandemia, levando muitas pessoas não diagnosticadas durante esse período a procurar o diagnóstico após o fim das restrições, justificando

o aumento no número de casos. Estudos e relatos na literatura têm documentado os desafios generalizados enfrentados no acesso ao diagnóstico de TB durante a pandemia de COVID-19, sugerindo que essa tendência não é exclusiva de uma região específica. (FEI et al., 2020; DANIEL et al., 2023).

Dentre esses casos, 1,3 milhão resultaram em óbito, incluindo meio milhão de mortes atribuídas à desorganização dos sistemas de saúde causada pela pandemia de COVID-19. Embora tenha havido uma redução de 19% no número global de mortes por TB entre 2015 e 2022, esse progresso ainda está significativamente abaixo da meta estabelecida pela OMS de reduzir as mortes em 75% até 2025 (WHO, 2023).

Além disso, aproximadamente 50% dos domicílios afetados pela TB enfrentam custos totais catastróficos devido à doença, o que está muito distante da meta da OMS de reduzir esse percentual a zero (WHO, 2023).

Estima-se que mais de 10 milhões de pessoas desenvolvam a doença todos os anos no mundo, apesar de ser prevenível e curável na maioria dos casos (OMS, 2023). No Brasil, mais de 80 mil pessoas continuam a adoecer por TB todos os anos. O governo brasileiro aderiu à meta adotada pela ONU de erradicar a doença como problema de saúde pública até 2030, antecipando a meta da OMS, até 2035 (OMS, 2023; Brasil, 2024).

Porém, os números alarmantes evidenciam a discrepância entre os resultados alcançados e as metas estabelecidas pela OMS. A TB está diretamente ligada a fatores socioeconômicos, como pobreza, migração, falta de acesso a recursos médicos e problemas nos sistemas de saúde pública (NIDOI et al., 2021). Superar esses desafios exigirá esforços concentrados e estratégias abrangentes para garantir o acesso universal a serviços de saúde de qualidade e implementar medidas preventivas eficazes.

2.3 AGENTE ETIOLÓGICO

A TB é causada por Mtb, um bacilo aeróbio, que possui uma forma alongada, com dimensões que variam entre 0,5 e 3 micrômetros de comprimento. Este patógeno apresenta características distintivas, tais como crescimento lento, capacidade de dormência, falta de motilidade e resistência ao álcool-ácido. Além disso, destaca-se o

envelope celular complexo, que inclui uma camada adicional rica em lipídios, glicolipídios e polissacarídeos (ROSSMAN; MACGREGOR, 1995; JACKSON, 2014).

Classificações mais antigas frequentemente agrupavam diversas espécies, incluindo Mtb, dentro de um grupo denominado complexo MTB, caracterizando-as com base em critérios morfológicos e bioquímicos. Contudo, com o avanço das técnicas de análise genética, a taxonomia foi revista para refletir com maior precisão as relações filogenéticas entre essas espécies. Devido à semelhança entre os genomas, as demais espécies do complexo foram re-identificadas como variedades de Mtb. Atualmente o gênero *Mycobacterium* compreende cerca de 197 espécies, sendo importante ressaltar que esse número está sempre em mudança (RIOJAS et al., 2018; PARTE et al., 2020; LPSN, 2024).

A parede celular de Mtb é uma estrutura extremamente complexa, predominantemente constituída por lipídios. A abundância desses lipídios confere impermeabilidade à parede celular, o que dificulta a penetração de agentes agressores e antibióticos. Essa característica é crucial para a proteção da bactéria contra fatores externos e tratamentos terapêuticos, estabelecendo a parede celular como uma barreira eficiente contra uma variedade de ameaças (DELOGU; SALI; FADDA, 2013; DAFFÉ; MAMADOU; MARRAKCHI, 2018).

2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.4.1 Baciloscopia

A análise de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), conhecida como baciloscopia, é um método fundamental no diagnóstico da TB que, quando conduzida adequadamente, pode identificar entre 60% a 80% dos casos pulmonares em adultos. Isso é de suma importância do ponto de vista epidemiológico, pois os casos com resultado positivo na baciloscopia são os principais propagadores da doença. A realização da baciloscopia de escarro é indicada em diferentes contextos: para indivíduos sintomáticos respiratórios durante a estratégia de busca ativa; em situações de suspeita clínica e/ou radiológica de TB pulmonar, independentemente do tempo de tosse; e para monitoramento e verificação da cura em casos pulmonares com confirmação laboratorial. Além disso, a baciloscopia de outros materiais biológicos é recomendada na investigação de TEP quando há suspeita clínica (BRASIL, 2019).

2.4.2 Cultura bacteriana

A cultura é um método considerado padrão-ouro no diagnóstico da TB (DU et al., 2019), caracterizado por elevada especificidade e sensibilidade, capaz de aumentar em até 30% o diagnóstico em casos pulmonares com resultado negativo na baciloscopia. Os meios de cultura sólidos mais comumente utilizados, como o Ogawa-Kudoh e Löwenstein-Jensen, são à base de ovo, apresentando como vantagens o baixo custo e o baixo índice de contaminação. Entretanto, sua principal desvantagem é o longo tempo necessário para a detecção, que pode variar de duas a oito semanas, devido ao crescimento lento de Mtb (BRASIL, 2008). Além desses, existem outros meios sólidos, como os meios Middlebrook 7H10 e 7H11, que são formulados à base de ágar (EL KHÉCHINE; DRANCOURT, 2011).

No Brasil, o meio de cultura líquido é amplamente utilizado em métodos automatizados, como o BD BACTEC™ MGIT™ (BRASIL, 2019), que utiliza uma base de caldo Middlebrook 7H9 modificado com um sensor fluorescente de oxigênio integrado. Esse método tem se mostrado mais sensível na detecção de baixas cargas bacterianas em comparação com os meios sólidos (NAMBIAR et al., 2017). Dada a natureza paucibacilar das amostras provenientes de casos de TEP, a cultura MGIT tem se destacado como uma abordagem promissora para o isolamento de Mtb em amostras extrapulmonares (NOUSSAIR et al., 2009).

O sistema BACTEC™ MGIT™, com sua base de caldo Middlebrook 7H9 modificado, incorpora um fluorocromo em silicone na parte inferior do tubo. Durante o crescimento bacteriano, o oxigênio livre no tubo é substituído por dióxido de carbono, resultando na ativação do fluorocromo e na emissão de fluorescência quando o tubo é visualizado sob luz ultravioleta. A intensidade da fluorescência correlaciona-se diretamente com a quantidade de oxigênio consumido, refletindo a atividade bacteriana (PALOMINO, 2006; SIDDIQI; RÜSCH-GERDES, 2006). Em termos de sensibilidade, o BACTEC™ MGIT™ apresenta uma sensibilidade de 88%, superior aos 76% observados com a cultura em meios sólidos. No entanto, a utilização de meio de cultura líquido não está isenta de desafios, incluindo um maior risco de contaminação por outros microrganismos ou micobactérias de importância clínica menor, bem como a possibilidade de contaminação cruzada durante o processamento e inoculação das amostras (RODRIGUES; VADWAI, 2012). Embora a confirmação da

micobacteriose dependa do resultado da cultura, é essencial realizar a identificação da espécie para distinguir entre Mtb e outras micobactérias (BRASIL, 2019).

2.4.3 Xpert® MTB/RIF Ultra

O Xpert® MTB/RIF Ultra é um avanço significativo na detecção molecular de Mtb e resistência à rifampicina, empregando a tecnologia de PCR em tempo real para identificar o gene *rpo*B (G.T. PROGRAMME, 2013; WHO, 2023). Desenvolvido para superar as limitações do Xpert® MTB/RIF, o teste visa aumentar a sensibilidade para espécimes paucibacilares (DORMAN et al., 2018). Desta forma, a versão Ultra consegue identificar Mtb em espécimes que contenham até o mínimo de 15,6 unidades formadoras de colônias por mililitro graças aos seus alvos de amplificação multicópia, IS6110 e IS1081 (CHAKRAVORTY et al., 2017).

A sensibilidade da versão Ultra em relação à cultura varia conforme o tipo de espécime clínico; ela demonstra alta sensibilidade para amostras de linfonodos, moderada para TB meníngea e baixa para fluidos pleurais (GOPALASWAMY et al., 2021; KOHLI et al., 2021). De modo geral, a sensibilidade do teste para amostras extrapulmonares é de aproximadamente 83 a 85% (WU et al., 2019; ZHANG et al., 2020). Contudo, a especificidade da versão Ultra, que é de 95,7% (KOHLI et al., 2021), para espécimes paucibacilares é inferior à da versão anterior, o que pode resultar em falsos positivos, especialmente em pacientes com infecções recentes ou resíduos de DNA de infecções passadas (WHO, 2017).

Os avanços proporcionados pelo Xpert® MTB/RIF Ultra representam um progresso importante na detecção de TB, especialmente em formas paucibacilares e na resistência à rifampicina. No entanto, possuem limitações como a possibilidade de resultados falsos-positivos e a variabilidade na sensibilidade para diferentes tipos de espécimes clínicos (GOPALASWAMY et al., 2021).

2.5 DORMÊNCIA

2.5.1 Terminologia

A variedade de termos usados para descrever os estados fisiológicos de Mtb e outras micobactérias causa problemas de comunicação entre pesquisadores. A falta de um consenso conceitual leva a discussões desnecessárias e dificulta o avanço dos estudos. Portanto, é importante buscar um consenso sobre a utilização correta dos termos para facilitar a compreensão mútua (LIPWORTH et al., 2016).

O estado fisiológico referido como "dormente" ou "dormência", discutido a seguir, descreve microrganismos que exibem certas características. Estas incluem a incapacidade de crescer em meio de cultura sólido, funções metabólicas reduzidas, regulação gênica alterada resultando no acúmulo de triacilglicerídeos em corpos lipídicos intracelulares, perda da resistência aos álcoois-ácidos, tolerância a antimicrobianos e baixa taxa de crescimento em meio líquido. Neste estudo, consideramos que o estado fisiológico de dormência se refere aos microrganismos que demonstram essas características, as quais são, de alguma forma, indicativas do estado encontrado no hospedeiro humano (LIPWORTH et al., 2016).

Outro termo comumente usado em estudos sobre o estado fisiológico de Mtb é "viável, mas não cultivável (VMNC)", que tradicionalmente descreve bactérias incapazes de crescer em meios de cultura onde normalmente se desenvolveriam em colônias (OLIVER, 2000). Recentemente, foi observado que as populações de Mtb-VMNC em amostras de pacientes com TB pulmonar não precisam necessariamente de um grupo específico de proteínas conhecidas como RPF (fatores promotores de ressuscitação); uma parte desses microrganismos pode retomar suas atividades metabólicas normais mesmo sem esses fatores, sendo chamados de "dependentes de sobrenadante de cultura líquida" ou simplesmente "dependentes de sobrenadante". Devido à atual dificuldade em distinguir fenotipicamente entre essas duas populações - dependentes de RPF e dependentes de sobrenadante (ROSSER et al., 2017) - todos os microrganismos capazes de ressuscitar com a adição de sobrenadante de cultura líquida de Mtb serão chamados de "dependentes de sobrenadante", fornecendo uma visão mais ampla das populações micobacterianas recuperadas com o uso desse recurso.

2.5.2 Estado de dormência

As bases microbianas subjacentes à infecção latente de Mtb implicam que as micobactérias em estado dormente apresentam maior resistência à ação de antimicrobianos, o que sugere uma possível inibição acentuada ou até mesmo uma supressão completa do seu metabolismo (FLYNN; CHAN, 2001). Experimentos em modelos com baixa tensão de oxigênio e restrição de nutrientes demonstraram a capacidade do Mtb de sobreviver por longos períodos em um estado não replicativo (WAYNE; HAYES, 1996), um fenômeno que pode explicar a persistência do microrganismo no hospedeiro. Embora seja comumente pressuposto que Mtb resida em lesões granulomatosas fibróticas nos pulmões, onde as condições de baixa tensão de oxigênio e escassez de nutrientes o mantenham em estado de dormência, o DNA do microrganismo foi encontrado em tecido pulmonar de indivíduos sem evidência de doença ativa ou prévia (HERNANDEZ-PANDO et al., 2000), indicando a possível influência de outros fatores, como moduladores do sistema imunológico, na existência e persistência de Mtb em estado de dormência.

A habilidade de Mtb em resistir a fatores estressantes exógenos, como hipoxia, óxido nítrico (NO), choque térmico, privação de nutrientes e pH ácido, é fundamental para sua manutenção em estado latente (VOSKUIL et al., 2003). A transição para esse estado dormente é influenciada por aspectos relacionados à imunidade, bioquímica e genética, sendo essencial para o controle da TB latente (PEDDIREDDY et al., 2017). Mudanças morfológicas em Mtb, como o aumento do comprimento em ambientes hipóxicos e o espessamento da parede celular em condições ácidas (SHLEEVA et al., 2011; SUN et al., 2023), são adaptações que auxiliam na sua sobrevivência sob estresse. Além disso, a capacidade de reativação em resposta a proteínas secretadas como as RPF e a presença de outros fatores no sobrenadante de cultura reforçam a complexidade do processo de latência e reativação (MUKAMOLOVA et al., 2010; CHENGALROYEN et al., 2016).

2.5.3 Possíveis implicações na terapêutica e transmissão

A relevância de uma terapia antimicrobiana eficiente é fundamental atualmente, considerando a complexidade dos desafios associados à resistência genotípica e à tolerância fenotípica dos microrganismos em relação aos fármacos. Além da

necessidade básica de que os microrganismos sejam sensíveis aos medicamentos, a eficácia do tratamento é influenciada por diversos outros fatores. Estes fatores incluem a capacidade dos microrganismos de ativar mecanismos de resposta a deficiências nutricionais, interações em populações heterogêneas e as dinâmicas da relação entre patógeno e hospedeiro, assim como o estado metabólico do microrganismo (TURAPOV et al., 2014).

Os fármacos disponíveis para o tratamento da TB apresentam uma eficácia notável em estudos laboratoriais, resultando em uma rápida eliminação bacteriana. Contudo, essa eficácia nem sempre se reflete nos resultados clínicos. Pacientes que não aderem a um tratamento regular e prolongado frequentemente enfrentam recaídas (XIE et al., 2005). Além disso, mesmo aqueles que seguem corretamente os esquemas terapêuticos recomendados podem sofrer recaídas meses ou até anos após a conclusão do tratamento (ROSSER et al., 2017). Isso indica que o uso dos medicamentos atuais não assegura a erradicação total de todas as subpopulações microbianas no paciente. Vários estudos laboratoriais demonstraram que as micobactérias podem desenvolver tolerância a antimicrobianos sob diferentes condições ou estímulos ambientais (MUKAMOLOVA et al., 2010; WAYNE et al., 2001; BETTS et al., 2002; XIE et al., 2005).

Adicionalmente, as subpopulações de Mtb que dependem de sobrenadante, situadas em um estado metabólico basal ou inativo, não são afetadas pela ação de antimicrobianos, tornando-se, assim, tolerantes a fármacos como rifampicina, isoniazida e estreptomicina (TURAPOV et al., 2014; LENAERTS; BARRY; DARTOIS 2015). Acredita-se que essas subpopulações sejam eliminadas de forma mais lenta (MUKAMOLOVA et al., 2010).

2.5.4 Ressuscitação (reativação da capacidade replicativa)

As substâncias com capacidade de ressuscitar microrganismos foram identificadas como Ressuscitation-promoting Factors (RPF), um conjunto de proteínas secretadas em concentrações extremamente baixas que promovem o crescimento de microrganismos. *Mycrococcus luteus*, por exemplo, possui apenas um gene codificador de RPF, crucial para seu crescimento in vitro, enquanto outras actinobactérias podem apresentar múltiplos genes semelhantes ao RPF (Kaprelyants et al., 2012). Mtb possui uma série de genes da família RPF, conhecidos como rpfA-

E. A eliminação de um único gene dessa família não compromete o crescimento dos bacilos metabolicamente ativos, conforme evidenciado por pesquisas que mostram que a remoção individual não resulta em déficits de crescimento (TUFARIELLO et al., 2004). No entanto, estudos indicam que a inativação de dois ou mais genes RPF pode afetar negativamente a capacidade de reativação de células dormentes, como demonstrado nas mutações ΔrpfAΔrpfB e ΔrpfBΔrpfD, que impactam a cinética de reativação (Russel-Goldman et al., 2008).

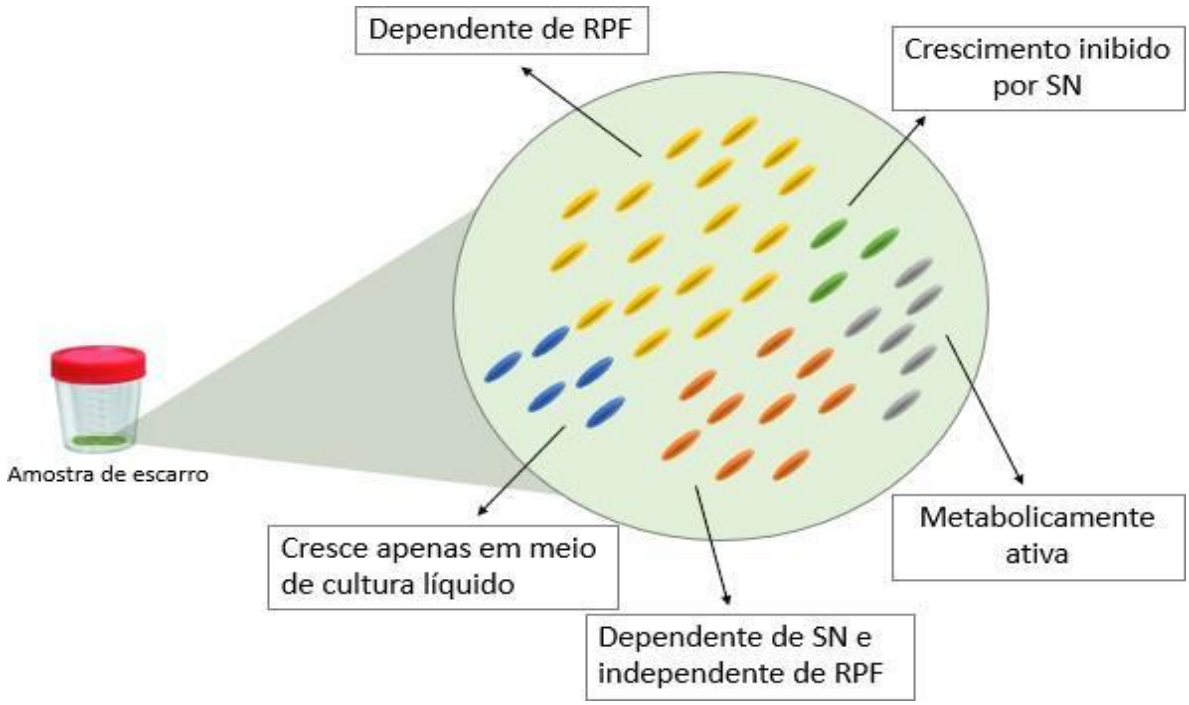
A relação funcional entre os genes RPF em Mtb revela que rpfB e rpfE possuem influência predominante sobre rpfD em determinadas características fenotípicas (Kana et al., 2008). Durante as fases iniciais da ressuscitação de bactérias dormentes, há um aumento na expressão de todos os genes RPF, embora com variações significativas nos estágios finais do processo (GUPTA et al., 2010). Os genes rpfA e rpfD se destacam por sua expressão significativa nas fases iniciais da ressuscitação, enquanto o gene rpfC mantém uma expressão consistente em todas as fases de crescimento sob privação de nutrientes (GUPTA et al., 2010).

Além das proteínas RPF, outros fatores não associados à disponibilidade de oxigênio também têm sido identificados como responsáveis pela reativação bem-sucedida de micobactérias dormentes. Os muropeptídeos, produtos da hidrólise da parede celular mediada por RPF, participam da ressuscitação de Mtb e atuam como moléculas sinalizadoras em interações "hospedeiro-patógeno" (BONECA, 2005). A presença de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e ácidos graxos insaturados livres também demonstrou capacidade de estimular a reativação de micobactérias dormentes, com a adição de ácidos graxos aumentando os níveis de cAMP em *Mycobacterium smegmatis* (SHLEEVA et al., 2013). Células dormentes de *M. smegmatis* formadas por acidificação gradual do meio de crescimento apresentaram acumulação significativa de trealose livre, evidenciando a importância dessa substância na viabilidade celular durante o processo de ressuscitação (SHLEEVA et al., 2017).

Em relação à heterogeneidade das subpopulações de Mtb no escarro de pacientes com TB pulmonar, foram identificadas cinco subpopulações distintas: (1) dependentes de RPF, (2) independentes de RPF, (3) que crescem somente em meio líquido sem suplementação de sobrenadante ou RPF, (4) que são inibidas por sobrenadante e (5) dependentes de outros fatores contidos no sobrenadante (Figura 1) (CHENGALROYEN et al., 2016). Estudos sugerem que compostos como cAMP,

muropeptídeos (NIKITUSHKIN et al., 2013) e lipídeos (ZHANG et al., 2001) podem estar associados à regulação da replicação de micobactérias não replicantes.

Figura 1 – Diferentes subpopulações de MTB em uma amostra de escarro de paciente com TB pulmonar. As diferentes populações de bacilos são diferenciadas por colorações. SN: Sobrenadante de cultura líquida de MTB. RPF: Fator Promotor de Ressuscitação. Imagem meramente ilustrativa, e as quantidades de cada população não representam uma proporção real.



Fonte: BRUNETTI (2021), com dados de CHENGALROYEN et al., (2016).

2.6 JUSTIFICATIVA

Um dos principais desafios no enfrentamento da TB reside nas falhas terapêuticas associadas à resistência de Mtb aos medicamentos disponíveis (WHO, 2017). Um fator crucial nesse processo evolutivo é a persistência aos fármacos, uma característica que resulta da heterogeneidade fenotípica das populações bacterianas, frequentemente devido ao crescimento lento (estado de dormência) da bactéria. Essa condição não replicativa, aliada a outras alterações bacterianas nesse estado, dificulta a ação dos antimicrobianos (BALABAN et al., 2019; BRAUNER et al., 2016).

O estado de dormência também impede a detecção desses bacilos pelos métodos microbiológicos convencionais. No entanto, estudos demonstram que a

utilização de fatores de ressuscitação (FR), como as proteínas RPF e o sobrenadante de cultura (SC), pode reativar essas populações (MUKAMOLOVA et al., 2010).

Assim, integrar os FR no diagnóstico laboratorial poderia aumentar a sensibilidade do teste, acelerar a detecção e melhorar a representatividade das populações bacterianas na amostra. Isso possibilitaria que um Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) subsequentemente realizado revelasse o perfil de sensibilidade de toda a população de bacilos, não apenas daquelas que foram capazes de se cultivar nos meios convencionais de diagnóstico.

Portanto, é fundamental investigar esses fatores para determinar como eles podem ser integrados aos métodos de detecção de Mtb, idealmente incorporando-os aos procedimentos diagnósticos fenotípicos convencionais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso de fatores de ressuscitação no sistema BACTEC-MGIT 960 para detecção de Mtb em espécimes clínicos de pacientes suspeitos de TB.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar o meio de cultura do sistema BACTEC-MGIT 960 com (MGIT+FC) e sem sobrenadante de cultura de Mtb para a detecção de micobactérias em espécimes considerados paucibacilares de pacientes suspeitos de TB;
2. Comparar o tempo de detecção de Mtb nos meios de cultura do sistema BACTEC-MGIT 960 com e sem fatores de ressuscitação em espécimes considerados paucibacilares de pacientes suspeitos de TB;
3. Comparar o meio de cultura do sistema BACTEC-MGIT 960 + FC com o método molecular Xpert MTB RIF Ultra para a detecção Mtb em espécimes considerados paucibacilares;
4. Verificar quais espécimes clínicos consideradas paucibacilares apresentam maior frequência de detecção de Mtb nos exames de cultura e molecular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESTRATÉGIA DO ESTUDO

4.1.1 Delineamento

Trata-se de um Estudo Experimental de Teste Diagnóstico para avaliação do uso de filtrado de cultura no sistema BD BACTEC™ MGIT™ para detecção de diferentes subpopulações de Mtb em espécimes clínicos pulmonares e extrapulmonares de pacientes com suspeita de TB.

4.1.2. Local

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (NDI/UFES).

4.1.3. Desenho

O presente estudo consistiu na análise da eficiência de um método de cultura líquida com incorporação de FR no sistema BD BACTEC™ MGIT™ para diagnóstico de TB a partir de espécimes clínicos presumidamente paucibacilares (que não escarro espontâneo e/ou induzido). Todos os espécimes clínicos avaliados foram inoculados simultaneamente no meio de cultura convencional do sistema BD BACTEC™ MGIT™ (padrão ouro) e no meio com filtrado de cultura para posterior comparação.

4.2. ESPÉCIMES CLÍNICOS

Os espécimes clínicos de pacientes com suspeita de TB foram obtidos do Laboratório de Micobacteriologia do Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo (LACEN-ES) e do Laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES. Só foram selecionados espécimes clínicos após o diagnóstico finalizado pelo laboratório, não havendo possibilidade de interferência no diagnóstico. Os espécimes só foram incluídos no estudo após finalizados todos os procedimentos de rotina, ou seja, foi

utilizado apenas o restante da amostra que seria descartada. Não foi utilizado qualquer dado clínico e/ou epidemiológico de pacientes.

No estudo em questão, foram incorporados espécimes clínicos, presumidamente paucibacilares, sendo em sua maioria extrapulmonares. Esses espécimes compreendem: líquido pleural, fragmento pleural, fragmento de pulmão, líquor, urina, lavado gástrico, lavado brônquico, linfonodo, fragmento de mama, líquido ascítico e outras, incluindo biópsias de diferentes sítios e diversos tipos de líquidos biológicos menos frequentes.

4.2.1 Critérios de inclusão

- Espécimes clínicos presumidamente paucibacilares (que não escarro espontâneo e/ou induzido), previamente cadastrados na rede de ambulatórios atendida pelos Laboratórios de Micobacteriologia do NDI/UFES e do LACEN-ES;
- Espécimes que já tenham sido liberadas para descarte pela rotina.

4.2.2 Critérios de exclusão

- Espécimes clínicos coletados há mais de 3 dias;
- Espécimes clínicos enviados para controle de tratamento.

4.3 PRODUÇÃO DO FILTRADO DE CULTURA DE MTB

4.3.1 Pré-cultura

Inicialmente, 1 mL de uma semente congelada da cepa de Mtb H37Rv (ATCC® 27294™) foi transferida para um tubo estéril com tampa de rosca contendo 8 a 10 pérolas de vidro estéreis. Após agitação mecânica por 30 segundos, adicionou-se 4 mL de água deionizada estéril e agitou-se por mais 10 segundos. Em seguida, a suspensão ficou em repouso por 20 minutos. Enquanto isso, adicionou-se assepticamente 28,5mL de caldo Middlebrook 7H9 (+10% OADC, +0,2% glicerol, +0,05% Tween 80) em dois frascos tipo Schott de 500mL estéreis (28,5mL em cada um). Então, após o tempo de repouso, transferiu-se 1,25 mL do sobrenadante da

suspensão bacteriana para cada um dos frascos com caldo Middlebrook 7H9 (diluição 1:20).

Após homogeneização por movimentos giratórios com os punhos, retirou-se uma alíquota de cada frasco para leitura da Densidade Ótica (DO) em comprimento de onda de 580nm. Os valores iniciais de absorbância obtidos foram registrados e os frascos tipo Schott contendo as pré-culturas foram incubados a 37°C sob agitação de 100 rpm. As leituras da DO foram repetidas diariamente até atingir 0,5 de absorbância.

Esse estágio denominado pré-cultura permite que as micobactérias que estavam congeladas entrem na fase logarítmica de crescimento.

4.3.2 Cultura

Inicialmente, pré-aqueceu-se a 37°C em banho-maria 360 mL de caldo Middlebrook 7H9 (+10% OADC, +0,2% glicerol, +0,05% Tween 80). Então, adicionou-se assepticamente 180 mL do caldo em dois frascos tipo Schott de 500mL estéreis (180 mL em cada um). Transferiu-se 20 mL das pré-culturas para os frascos com caldo Middlebrook 7H9 (diluição 1:10).

Assim como na pré-cultura, após homogeneização por movimentos giratórios com os punhos, retirou-se uma alíquota de cada frasco para leitura da DO_{580}. Os valores iniciais de absorbância obtidos foram registrados e os frascos tipo Schott contendo as culturas foram incubados a 37°C sob agitação de 100 rpm. As leituras da DO foram repetidas diariamente até atingir 0,8 de absorbância.

Esta etapa denominada como cultura principal proporciona que as bactérias se multipliquem e produzam metabólitos solúveis.

4.3.3 Filtração da cultura

Após o crescimento, aliquotou-se as culturas de 30 em 30 mL em tubos cônicos de centrífuga (tipo Falcon) de 50mL. Os tubos foram fechados com segurança e centrifugados a 3.000xg, por 15 minutos, a 4°C e sem freio. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um sistema de filtração a vácuo equipado com filtros de membrana de polietersulfona com porosidade de 0,22 µm, utilizando uma bomba de vácuo, garantindo a conformidade com os procedimentos de biossegurança do laboratório. A filtração foi realizada duas vezes para garantir a

remoção eficiente das células bacterianas de Mtb, permitindo a passagem dos produtos metabólicos secretados pelas bactérias, incluindo os fatores de ressuscitação.

4.3.4 Liofilização

O filtrado resultante foi distribuído em alíquotas de 4 mL em tubos cônicos de centrífuga (tipo Falcon) de 15 mL. Os tubos foram deitados em uma bandeja de plástico para aumentar a superfície de contato do líquido com o ar no interior do tubo, mas sem que o líquido atingisse a tampa. Então, os tubos foram congelados a -80°C por 24 horas. Posteriormente, os tubos foram transferidos para um liofilizador de bancada (FreeZone® Benchtop Freeze Dryer; Labconco), onde o filtrado congelado foi liofilizado a -50°C durante 48h.

4.3.5 Armazenamento

Após o processo de liofilização, os tubos com o liofilizado contendo os produtos microbianos foi armazenado novamente em freezer a -80°C. Esse material foi utilizado por até 6 meses.

4.3.6 Controle de Qualidade

Os lotes do FC preparados foram submetidos ao controle de qualidade, que consiste em:

- Controle de Esterilidade: Para confirmar a esterilidade do FC, alíquotas de 1 mL de cada lote foram espalhadas em ágar Müeller-Hinton para detecção de contaminantes e em ágar Middlebrook 7H11 para detecção de Mtb. As placas de ágar foram incubadas a 37°C por até 1 semana (Müeller-Hinton) e 8 semanas (Middlebrook 7H11).
- Controle Microbiológico: Para confirmar a ação do FC, utilizou-se uma alíquota congelada de um escarro sabidamente positivo pertencente ao criobanco do Laboratório de Micobacteriologia do NDI/UFES para realizar o ensaio de Número Mais Provável (NMP) conforme descrito anteriormente (CHENGALROYEN, 2016); (MUKAMOLOVA, 2010; ALMEIDA JÚNIOR, 2020). Resumidamente, foi utilizada uma

microplaca de 48 poços adicionando nas 3 primeiras colunas 450 µL de caldo Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC (Oleic Acid-Albumin-Dextrose-Complex) (BD™ BBL™), 0,05% de Tween 80 e antibióticos (BD™ BBL™ MGIT™ PANTA™), e nas 3 últimas colunas foi adicionado 450 µL do meio anterior acrescido de FC. Foi adicionado então 50 µL da amostra descongelada em cada poço da primeira linha da placa de 48 poços, seguindo a diluição seriada até os poços da última linha. As placas foram vedadas com selo de risco biológico e incubadas a 37 °C por oito semanas, seguidas de avaliação visual de crescimento usando um espelho invertido. O número total de bactérias no ensaio NMP foi estimado usando o programa de cálculo de NMP, versão 6, desenvolvido pela Freie Universität Berlin (JARVIS; WILRICH; WILRICH, 2010) disponível em http://www.wiwiss.fu.berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/wilrich/index.html.

4.4 EXAMES LABORATORIAIS

4.4.1 Classificação dos espécimes clínicos

Os espécimes clínicos utilizados no estudo compreendem dois tipos diferentes. Alguns são considerados não estéreis, pois possuem uma microbiota do paciente associada e que pode contaminar a cultura e impedir o isolamento de micobactérias. Nestes casos, os espécimes passaram pelo processo de descontaminação de N-Acetil-L-Cisteína/Hidróxido de Sódio (NALC/NaOH). Por outro lado, os espécimes provenientes de sítios estéreis e que, portanto, não possuem uma microbiota associada, não precisaram passar por esta etapa de descontaminação.

Os espécimes foram classificados da seguinte forma:

- Não-estéreis = lavado gástrico, lavado brônquio-alveolar e urina.
- Estéreis = fragmento de mama, fragmento de pleura, fragmento de pulmão, líquor, biópsia de linfonodo, líquido ascítico, líquido pleural.

4.4.2 Processamento dos espécimes clínicos não-estéreis

Os espécimes clínicos não estéreis inicialmente foram transferidos para tubos cônicos de centrífuga (tipo Falcon) de 50 mL graduados com a respectiva identificação. Para o lavado gástrico os espécimes que não estavam em solução

tampão de fosfato dissódico a 10%, foram tratados dentro das primeiras 4 horas após a coleta para garantir a preservação e a acurácia dos resultados.

Após determinado o volume do espécime, um volume igual de solução digestora (NALC 0,5% + NaOH 2% + Citrato de Sódio 1,45%) foi adicionado. A mistura foi agitada mecanicamente por 20 segundos e deixada em repouso por 15 minutos para permitir a descontaminação adequada. Após essa etapa, adicionou-se solução de tampão fosfato (pH = 6,8) a cada tubo até completar o volume de 50 mL.

Posteriormente, todas os espécimes foram centrifugados a 3.000xg, por 15 minutos, a 4°C e sem freio, assegurando a sedimentação eficiente. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado. O sedimento residual foi ressuspenso com 2 mL de tampão fosfato utilizando-se uma pipeta Pasteur descartável e estéril.

4.4.3 Processamento dos espécimes clínicos estéreis

Como esses espécimes não precisaram ser descontaminados como os espécimes não-estéreis, eles foram apenas concentrados por centrifugação a 3.000xg, por 15 minutos, a 4°C e sem freio. O sedimento residual também foi ressuspenso com 2 mL de tampão fosfato. Em relação aos tecidos, os fragmentos foram transferidos para um graal estéril contendo salina a 0,85% e macerados antes da centrifugação.

4.4.4 Baciloscopia

Para a detecção de Mtb, adicionou-se 30 µL dos espécimes processados em lâminas de microsopia para realização da técnica de baciloscopia com coloração de Auramina-O. Após preparados, os esfregaços foram fixados a 80°C por 1 hora em chapa aquecedora. Em seguida, as lâminas foram colocadas em um suporte na pia para o processo de coloração. Inicialmente, cada lâmina foi coberta com uma solução de auramina fenicada a 0,1% e deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos, permitindo a interação adequada da auramina com o esfregaço.

As lâminas foram então lavadas com um jato de água de baixa pressão para remover qualquer resíduo de auramina. Após a lavagem, as lâminas foram completamente cobertas com uma solução de álcool-ácido a 1% (Etanol 99% : HCl 1%) e deixadas por 2 minutos.

Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente com água e então cobertas com uma solução de permanganato de potássio a 0,5% por 2 minuto.

Posteriormente, foram lavadas e visualizados sob microscópio de fluorescência. A identificação de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) foi realizada de acordo com critérios padronizados de interpretação do Ministério da Saúde para espécimes que não escarro (BRASIL, 2022).

- Negativo: nenhum BAAR encontrado em 100 campos
- Positivo: pelo menos 1 BAAR encontrado em 100 campos

4.4.5 GeneXpert MTB/RIF Ultra

O processamento dos espécimes seguiu as instruções do fabricante do sistema GeneXpert (Cepheid), que consta no Manual do Ministério da Saúde (BRASIL, 2022). Os espécimes foram preparados e misturados com o reagente de lise, seguindo as proporções padronizadas para cada tipo de espécime. Essa etapa promove a desintegração das células bacterianas e a liberação do DNA.

Após a mistura inicial com o reagente de lise, a amostra foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, permitindo a completa desintegração das células bacterianas. Durante este período, a mistura foi homogeneizada em intervalos regulares para garantir uma lise eficiente.

Em seguida, 2 mL da amostra lisada foram transferidos para o cartucho de teste GeneXpert MTB/RIF Ultra, que foi então colocado no módulo de teste do sistema GeneXpert. O processo de amplificação e detecção de ácidos nucleicos foi realizado automaticamente pelo sistema, que utiliza técnicas de PCR em tempo real para a amplificação dos genes-alvo específicos de Mtb.

O sistema GeneXpert completa o processo de amplificação e análise em menos de 2 horas, durante as quais o software do equipamento monitora a amplificação dos ácidos nucleicos em tempo real, fornecendo resultados quantitativos e qualitativos. O GeneXpert fornece resultados baseados na quantidade de material genético de Mtb detectado, categorizando-os em: negativo, traços, muito baixo, baixo, médio e alto. Neste trabalho, os resultados classificados como traços foram considerados negativos para amostras pulmonares e positivos para amostras extrapulmonares (.

4.4.6 Cultura em meio sólido à base de ovo

Após o processamento dos espécimes, foi inoculado 300 µL de cada amostra em frascos contendo meio de cultura sólido à base de ovo (Ogawa-Kudoh ou Löwenstein-Jensen). Os frascos foram incubados a 37ºC durante 8 semanas, período durante o qual foram examinados regularmente para identificação de características morfológicas típicas de Mtb.

Durante o período de incubação, foi analisado o tempo de crescimento e a morfologia macroscópica das colônias para identificação preliminar de Mtb. Posteriormente, as culturas positivas foram submetidas ao Teste Rápido MPT64 (MPT-64 TB Ag Rapid Test) da Abbott para confirmação específica da presença de Mtb.

O resultado da cultura sólida foi liberado em escala semi-quantitativa (BRASIL, 2022):

- Negativa: nenhuma colônia isolada
- Positiva: 1 a 19 colônias isoladas
- Positiva +: 20 a 100 colônias isoladas
- Positiva ++: mais de 100 colônias separadas
- Positiva +++: colônias confluentes (tapete)
- Contaminada: crescimento de microrganismos que não micobactérias

4.4.7 Cultura em sistema BD BACTEC MGIT

Cada espécime clínico foi inoculado em dois tubos de cultura separados para a avaliação do crescimento microbiano. O primeiro tubo continha o sobrenadante de cultura de Mtb liofilizado, previamente preparado por meio da adição do sobrenadante ao meio líquido BD BACTEC™ MGIT™, seguido da inversão do tubo para garantir a completa dissolução do liofilizado. Após a adição, o tubo foi mantido em refrigeração a 4°C por 30 minutos para permitir uma homogeneização mais eficiente. Além disso, foi adicionado 0,8 µL de PANTA 2X, uma formulação com o dobro da concentração do suplemento padrão PANTA (composto por polimixina B, anfotericina B, nalidíxico ácido, trimetoprima e azlocilina), otimizada para minimizar a contaminação por outros microrganismos. Em seguida, 0,5 µL da amostra clínica foi inoculado no tubo contendo o sobrenadante e o PANTA.

O segundo tubo, utilizado como controle, seguiu os mesmos passos de preparação, exceto pela ausência do sobrenadante de cultura de Mtb. Ambos os tubos foram, então, incubados no sistema automatizado BD BACTEC™ MGIT™ 960 para o monitoramento contínuo do crescimento microbiano.

A positivação de um tubo no sistema BD BACTEC™ MGIT™, indica consumo de oxigênio dentro do tubo, que pode ser crescimento de Mtb, ou de micobactérias não tuberculosas (MNT) ou de outros microrganismos aeróbios. Portanto, após a positivação, o tubo é removido para análises adicionais. Primeiramente, foi confeccionada uma lâmina diretamente da cultura do MGIT e corada com coloração de Ziehl-Neelsen (ZN). Esta técnica visa identificar se o consumo de oxigênio foi devido a um BAAR ou a um microrganismo contaminante. Além disso, pode-se observar características como a presença do fator corda, importante para a diferenciação de Mtb das MNT.

Após a confirmação das características microscópicas na lâmina, foi realizado o ensaio de inibição do crescimento em ácido p-nitrobenzóico (PNB) (500 µL/mL) diretamente da cultura líquida. Este procedimento buscou identificar se o BAAR presente no tubo era Mtb ou se era MNT, já que Mtb é sensível ao PNB e a maioria das MNT é resistente. Não se fez uso do teste MPT64 direto do meio líquido, pois o SC possui MPT64 em sua composição, então as culturas com SC sempre dão positivo nesse teste, mesmo não havendo crescimento de qualquer microrganismo.

O resultado da cultura líquida foi liberado como:

- Negativa: nenhum crescimento detectado em 42 dias
- Positiva: crescimento de BAAR detectado em 42 dias (tempo de positivação registrado em dias)
- Contaminada: crescimento de microrganismos que não micobactérias

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

- Análise de concordância entre os resultados obtidos no MGIT e no MGIT com filtrado de cultura (MGIT+FC) utilizando o coeficiente de Kappa, com o objetivo de avaliar a consistência entre os métodos na detecção de micobactérias. Além disso, aplicamos o teste de qui-quadrado para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos;
- Análise comparativa dos resultados entre os testes Xpert MTB/RIF Ultra e MGIT+FC, bem como entre o Xpert MTB/RIF Ultra e o MGIT, utilizando o teste qui-quadrado para determinar a significância estatística das diferenças observadas nas proporções de resultados negativos, positivos e contaminados;
- Análise do tempo de positivação dos testes MGIT+FC e MGIT, utilizando o teste de Mann-Whitney U para comparar as medianas dos dois grupos. Além disso, aplicamos o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados.
- Foram calculadas as métricas de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de verossimilhança positiva (RVP), razão de verossimilhança negativa (RVN) e acurácia para avaliar o desempenho dos testes diagnósticos. A sensibilidade foi determinada pela razão entre o número de verdadeiros positivos e a soma dos verdadeiros positivos com os falsos negativos, refletindo a capacidade do teste em identificar corretamente os casos positivos. A especificidade foi calculada pela razão entre o número de verdadeiros negativos e a soma dos verdadeiros negativos com os falsos positivos, indicando a capacidade do teste em reconhecer corretamente os casos negativos. O valor preditivo positivo foi obtido pela razão entre o número de verdadeiros positivos e a soma dos verdadeiros positivos com os falsos positivos, enquanto o valor preditivo negativo foi calculado pela razão entre o número de verdadeiros negativos e a soma dos verdadeiros negativos com os falsos negativos. A razão de verossimilhança positiva foi calculada como a razão entre a sensibilidade e a taxa de falsos positivos, enquanto a razão de verossimilhança negativa foi obtida pela razão entre a taxa de falsos negativos e a especificidade. Por fim, a acurácia foi calculada como a soma dos verdadeiros positivos e verdadeiros negativos dividida pelo total de amostras analisadas.

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFES e aprovado pelo Parecer nº 5.844.657 (CAAE: 65501122.9.0000.5060).

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

5. RESULTADOS

Em relação ao controle de esterilidade do filtrado de cultura, não houve crescimento em ágar Müeller-Hinton ou ágar Middlebrook 7H11 durante o tempo de incubação (1 e 8 semanas, respectivamente), indicando que o filtrado de cultura estava estéril.

Com base nos resultados observados na Figura 2 e Tabela 1, o meio 7h9 detectou apenas 46 CFU/ml enquanto o meio com filtrado de cultura detectou 850000, uma diferença de 4,2 logs entre as populações detectadas. Esse resultado mostra a ação do filtrado de cultura produzido para reativar a capacidade replicativa de subpopulações dormentes.

Figura 2 – Microplaca de 48 poços do controle microbiológico do filtrado de cultura.

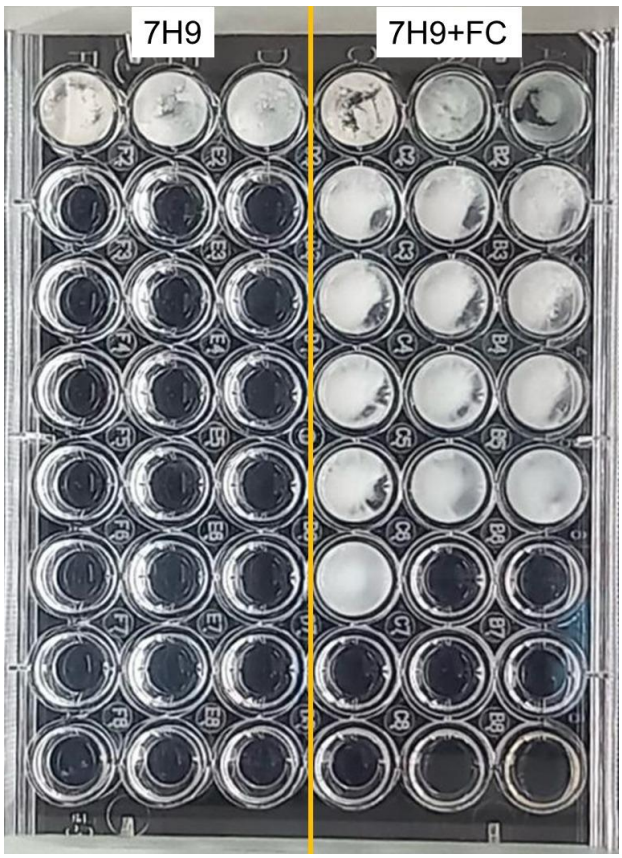


Tabela 1 – Resultado do controle microbiológico do filtrado de cultura.

	NMP	Log	DP	IC.Min	IC.Max
7H9	46	1,7	0,31	11	190
7H9+FC	850000	5,9	0,33	190000	3800000

NMP: Número mais provável; DP: Desvio Padrão; IC.Min: Intervalo de Confiança 95% Mínimo; IC.Max: Intervalo de Confiança 95% Máximo. 7H9: Caldo Middlebrook 7H9; 7H9+FC: Caldo Midlebrook 7H9 com Filtrado de Cultura.

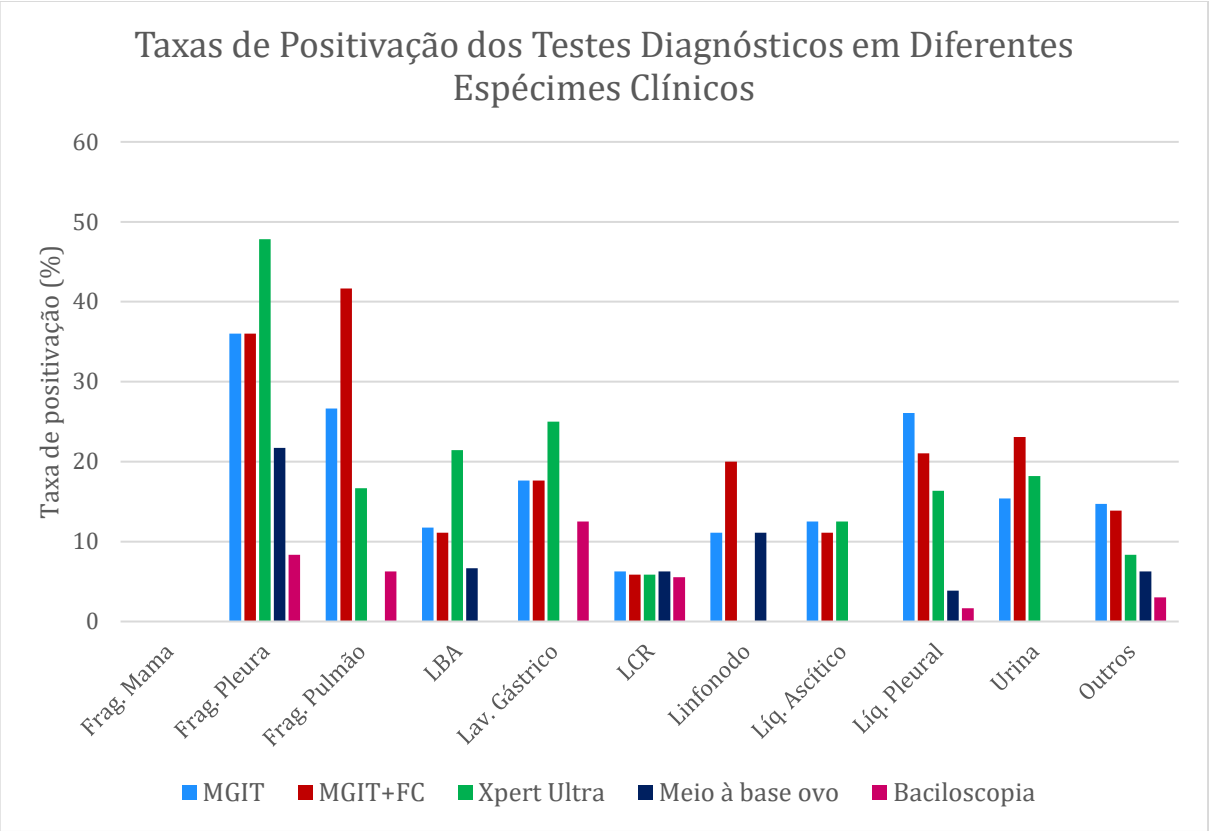
No total, foram analisados 245 espécimes clínicos (Tabela 2), com destaque para o líquido pleural, que representou a maioria das amostras (24,90%; n = 61). Seguiram-se o fragmento de pleura (10,20%; n = 25) e o fragmento de pulmão (7,76%; n = 19). Espécimes menos frequentes incluíram lavados brônquicos e líquido cefalorraquidiano (7,35%; n = 18 cada), além de lavado gástrico (6,94%; n = 17), linfonodo e fragmento de mama (4,49%; n = 11 cada). O líquido ascítico (3,67%; n = 9) e a urina (6,53%; n = 16) também foram representativos, mas menos comuns.

Tabela 2 – Distribuição quantitativa dos espécimes clínicos analisados.

Espécime clínico	n	%
Fragmento mama	11	4,49
Fragmento pleura	25	10,20
Fragmento pulmão	19	7,76
Lavado broncoalveolar	18	7,35
Lavado gástrico	17	6,94
Líquido cefalorraquidiano	18	7,35
Linfonodo	11	4,49
Líquido ascítico	9	3,67
Líquido pleural	61	24,90
Urina	16	6,53
Outros	40	16,33
Total	**245**	**100**

Para o cálculo das taxas de positivação (Figura 3), foram considerados apenas os resultados válidos obtidos pelos diferentes testes diagnósticos. Espécimes que apresentaram contaminação ou para os quais os testes não foram realizados foram excluídos da análise.

Figura 3 – Taxas de positivação dos testes diagnósticos em diferentes espécimes clínicos. O eixo (y) representa a porcentagem de amostras positivas, enquanto o eixo (x) exibe os diferentes tipos de espécimes analisados. LBA: Lavado Broncoalveolar. LCR: Líquido Cefalorraquidiano.



A análise de concordância entre os métodos MGIT e MGIT+FC na detecção de micobactérias mostrou uma concordância quase perfeita, com coeficiente de Kappa de 0,857 (p-Kappa = 0,038), indicando boa concordância entre os dois testes (Tabela 3). Dos 245 espécimes testados, a maioria (183) foi negativa em ambos os métodos, enquanto 39 foram positivas em ambos. Apenas 1 amostra foi positiva no MGIT e negativa no MGIT+FC, e 4 amostras apresentaram o inverso. Contaminações ocorreram em 10 amostras em ambos os métodos.

A análise de qui-quadrado indicou uma associação significativa ($p < 0,001$) entre os resultados dos dois métodos, sugerindo uma forte correlação na detecção de micobactérias, com poucas discrepâncias observadas entre eles.

Tabela 3 - Análise de concordância entre MGIT+FC e MGIT na detecção de micobactérias.

	MGIT						
		n					
MGIT+FC	Negativo	Positivo	Contaminado	Total	p	Coeficiente de Kappa	p-Kappa
Negativo	183	1	1	185			
Positivo	4	39	0	43	<0,001	0,857	0.038
Contaminado	7	0	10	17			
Total	194	40	11	245			

A Tabela 4 apresenta as características das amostras que exibiram discordâncias entre os métodos MGIT e MGIT suplementado com filtrado de cultura (MGIT+FC) na detecção de micobactérias. Dentre os 245 espécimes analisados, cinco amostras mostraram resultados discrepantes. Três das amostras discordantes foram também positivas no Gene Xpert com carga "very low", enquanto duas amostras foram detectadas apenas pelo MGIT+FC e não apresentaram positividade em nenhum outro método diagnóstico.

Tabela 4 – Caracterização das amostras discordantes entre MGIT+FC e MGIT na detecção de micobacérias.

ID	**Tipo espécime**	**MGIT+FC**	**MGIT**	**Xpert MTB/RIF Ultra**	**Cultura sólida**	**Baciloscopia**
F018	Frag pleura	+	-	Very low	-	+
F133	Frag pulmão	+	-	Very low	-	-
F174	Urina	+	-	Não realizado	-	-
F205	Linfonodo	+	-	Negativo	-	-
F123	Frag. pleura	-	+	Very low	-	-

Os parâmetros de desempenho do teste MGIT+FC em relação ao MGIT padrão para a detecção de micobactérias estão descritos na Tabela 5. O teste MGIT+FC demonstrou alta sensibilidade (97,50%) e especificidade (97,86%), indicando sua elevada capacidade tanto de identificar verdadeiros positivos quanto de descartar corretamente os casos negativos. O valor preditivo positivo (VPP) foi de 90,70%,

enquanto o valor preditivo negativo (VPN) foi ainda maior, alcançando 99,50%, ressaltando a eficiência do teste em confirmar a ausência de micobactérias em espécimes negativos.

A razão de verossimilhança positiva (RVP) foi de 45,58, sugerindo que uma amostra positiva no MGIT+FC tem 45 vezes mais risco de realmente estar infectada. Já a razão de verossimilhança negativa (RVN) foi extremamente baixa, 0,0255, refletindo a baixa probabilidade de um resultado negativo ser incorreto. A acurácia global do método foi de 97,80%, reforçando o excelente desempenho do MGIT+FC na detecção de micobactérias, mesmo em comparação com o método MGIT padrão.

Tabela 5 – Desempenho do MGIT+FC em relação ao MGIT para detecção de micobactérias.

Métrica	Valor
Sensibilidade	97,50%
Especificidade	97,86%
Valor preditivo positivo (VPP)	90,70%
Valor preditivo negativo (VPN)	99,50%
Razão de verossimilhança positiva (RVP)	45,58
Razão de verossimilhança negativa (RVN)	0,0255
Acurácia	97,80%

Entre os espécimes classificadas como negativas no teste Xpert MTB/RIF Ultra, 81,10% (n = 150) foram também negativas no MGIT+FC, enquanto 37,20% (n = 16) dos espécimes foram identificados como positivos no MGIT+FC. Observa-se, ainda, que a categoria "Traços" teve 2,70% (n = 5) de espécimes negativos e 2,30% (n = 1) positivas (Tabela 6).

Os espécimes classificados como "Very low" apresentaram 1,10% (n = 2) como negativos e 30,20% (n = 13) como positivos no MGIT+FC, enquanto os espécimes "Low" mostraram 1,10% (n = 2) de resultados negativos e 20,90% (n = 9) positivos. Não houve registros nas categorias "Medium" e "High" para resultados positivos no MGIT+FC.

Além disso, 14,10% (n = 26) dos espécimes não realizados pelo Xpert foram negativos no MGIT+FC, enquanto 7,00% (n = 3) foram positivos e 11,80% (n = 2) foram contaminados. A análise estatística indica uma diferença significativa entre os resultados dos dois testes ($p < 0,001$), sugerindo que os resultados do Xpert MTB/RIF Ultra e do MGIT+FC têm um desempenho diferente na identificação de espécies de micobactérias.

Tabela 6 – Comparação dos resultados entre os testes Xpert MTB/RIF Ultra e MGIT+FC.

		MGIT+FC		
	Negativo	Positivo	Contaminado	p
		n (%)		
Xpert MTB/RIF Ultra				
Negativo	150 (81.10)	16 (37.20)	12 (70.6)	
Traços	5 (2.70)	1 (2.3)	2 (11.80)	
Very low	2 (1.10)	13 (30.20)	1 (5.90)	
Low	2 (1.10)	9 (20.90)	0 (0.00)	p<0.001*
Medium	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
High	0 (0.00)	1 (2.30	0 (0.00)	
Não realizado	26 (14.10)	3 (7.00)	2 (11.80)	
Total	185 (100.0)	43 (100.0)	17 (100.0)	

A Tabela 7 apresenta a comparação dos resultados entre os testes Xpert MTB/RIF Ultra e MGIT para a identificação de Mtb. Entre os espécimes que foram negativos no teste Xpert, 79,90% (n = 155) também foram negativos no MGIT, enquanto 37,5% (n = 15) dos espécimes foram identificados como positivos no MGIT. Em relação às amostras na categoria "Traços", 2,60% (n = 5) foram negativas e 2,50% (n = 1) positivas no MGIT.

Os espécimes classificados como "Very low" apresentaram 2,10% (n = 4) como negativos e 30,00% (n = 12) como positivos no MGIT, enquanto os espécimes "Low" mostraram 1,00% (n = 2) de resultados negativos e 22,50% (n = 9) positivos. Não houve registros de resultados positivos nas categorias "Medium" e "High".

Adicionalmente, 14,40% (n = 28) dos espécimes não realizados pelo Xpert foram negativos no MGIT, enquanto 5,00% (n = 2) foram positivos e 9,10% (n = 1) foram contaminados. A análise estatística indica uma diferença significativa entre os resultados dos dois testes (p < 0,001), sugerindo que o desempenho do Xpert MTB/RIF Ultra é estatisticamente distinto do MGIT na identificação de espécies de micobactérias.

Tabela 7 – Comparação dos resultados entre os testes Xpert MTB/RIF Ultra e MGIT.

	MGIT			
	Negativo	**Positivo**	**Contaminado**	**p**
		n (%)		
Xpert MTB/RIF Ultra				
Negativo	155 (79.90)	15 (37.5)	8 (72.70)	
Traços	5 (2.60)	1 (2.50)	2 (18.20)	
Very low	4 (2.10)	12 (30.00)	0 (0.00)	
Low	2 (1.00)	9 (22.50)	0 (0.00)	p<0.001*
Medium	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
High	0 (0.00)	1 (2.50)	0 (0.00)	
Não realizado	28 (14.40)	2 (5.00)	1 (9.10)	
Total	194 (100.0)	40 (100.0)	11 (100.0)	

A Tabela 8 apresenta a comparação das métricas de desempenho entre os testes Xpert Ultra, Cultura em Meio à Base de Ovo e Baciloscopia, em relação ao padrão ouro, MGIT. Destaca-se que o Xpert Ultra apresentou a maior sensibilidade (60,53%) e a boa especificidade (98,90%) em comparação com os outros métodos. A Cultura em Meio à Base de Ovo demonstrou uma taxa de VPP de 100%, o que indica que todos os casos positivos detectados por este método estavam corretos. É importante notar que o valor N.A. para a métrica RVP do Meio à Base de Ovo indica que não houve casos de falsos positivos detectados por esse teste. A Baciloscopia se destacou pela alta especificidade (98,90%).

Tabela 8 – Comparação das métricas de desempenho entre os testes diagnósticos Xpert Ultra, cultura em meio à base de ovo e baciloscopia.

Métrica	**Xpert Ultra**	**Meio à base ovo**	**Baciloscopia**
Sensibilidade	60,53%	40%	13,90%
Especificidade	93,37%	91%	98,90%
VPP	67,65%	100%	71,40%
VPN	91,18%	91%	84,80%
RVP	9,13	N.A.	12,64
RVN	0,42	0,6	0,87
Acurácia	87,25%	91%	84,30%

A Tabela 9 resume a análise do tempo de positivação dos testes MGIT+FC e MGIT. O grupo MGIT+FC apresentou uma média de 18,68 dias, enquanto o grupo MGIT teve uma média de 17,82 dias. O teste de Mann-Whitney resultou em um valor de p = 0,974, sugerindo que não houve diferença estatisticamente significativa entre

os dois testes. Além disso, o teste de normalidade de Shapiro-Wilk indicou que ambos os grupos não seguem uma distribuição normal.

Tabela 9 – Análise do tempo de positivação dos testes MGIT+FC e MGIT.

Teste	N	Média (dias)	Mediana	Desv. Padrão	Shapiro-Wilk p	Mann-Whitney U	p-value
MGIT+FC	35	18,68	15,1	9,51	0,001	540	0,974
MGIT	31	17,82	16,3	7,46	0,031		

Em relação à identificação dos microrganismos encontrados nos espécimes clínicos (Tabela 10), foram identificados 35 casos (79,55%) de Mtb, confirmados por meio dos testes MPT-64 e inibição de crescimento com PNB e microscopia óptica. Além disso, 9 casos (20,45%) foram classificados como micobactérias não tuberculosas (MNT), confirmados por meio do exame de microscopia óptica. No total, foram encontradas espécies de *Mycobacterium* em 44 espécimes clínicos.

Tabela 10 – Identificação das micobactérias encontradas nos espécimes clínicos.

Identificação	n	%
Mtb	35	79,55
MNT	9	20,45
Total	**44**	**100**

Legenda: Mtb = *Mycobacterium tuberculosis.* MNT= Micobactérias não tuberculosas.

6. DISCUSSÃO

Espécimes clínicos analisados.

Embora o Xpert Ultra tenha mostrado maiores taxas de positivação em alguns espécimes específicos, de forma geral, a cultura líquida demonstrou melhores resultados na detecção de Mtb em diversos tipos de amostras (Figura 3).

Dentre os espécimes clínicos analisados, o líquido pleural foi o mais frequente, correspondendo a 24,9% de todos os espécimes incluídos no estudo (Tabela 2). Esse achado está em consonância com os resultados do estudo de Bouzouita et al. (2024), que também identificaram o líquido pleural como o tipo de amostra mais comum, representando 44% das amostras analisadas. Além disso, no estudo conduzido por Slail et al. (2023), o líquido pleural foi classificado como a segunda amostra mais frequente, representando 21% do total. O derrame pleural tuberculoso, sendo a segunda forma mais prevalente de TB, pode ser explicado pela proximidade anatômica entre a pleura e os pulmões, além da capacidade de Mtb de se disseminar por via hematógena (KARKHANIS; JOSHI, 2012; MCNALLY; ROSS; GLEESON, 2024).

Uso do filtrado de cultura de Mtb no Bactec MGIT 960.

Os dados obtidos indicam que a adição de filtrado de cultura de Mtb ao sistema MGIT apresenta vantagens significativas em comparação ao meio padrão (MGIT). O MGIT+FC identificou 43 espécimes positivos, enquanto o MGIT padrão detectou apenas 40 (Tabela 3). Embora a diferença numérica pareça pequena, a inclusão do filtrado de cultura demonstra um aumento na sensibilidade do teste. A análise de sensibilidade do MGIT+FC revelou uma taxa alta de 97,50% (Tabela 3), o que é particularmente relevante em contextos clínicos, onde a detecção de amostras paucibacilares é desafiadora devido à baixa carga bacteriana que pode não ser captada por outros métodos (NOUSSAIR et al., 2009).

Cinco espécimes apresentaram resultados discordantes entre MGIT e MGIT+FC (Tabela 4), com três deles positivando no Gene Xpert como "very low", o que evidencia a natureza paucibacilar dessas amostras. Além disso, dois espécimes foram

detectados apenas pelo MGIT+FC, sem que Mtb fosse identificado por nenhum outro teste diagnóstico disponível.

Em quatro espécimes, a positividade foi observada apenas no teste suplementado com filtrado de cultura (MGIT+FC), enquanto um espécime positivou somente no teste não suplementado (MGIT) (Tabela 3). Essa divergência pode ser atribuída à diversificação de subpopulações de Mtb no mesmo espécime, conforme descrito por CHENGALROYEN et al. (2016). O filtrado de cultura pode ter promovido o crescimento de subpopulações que dependem de fatores de ressuscitação, inibindo ao mesmo tempo subpopulações que foram adversamente afetadas pelo sobrenadante. Apesar desse possível efeito inibitório, a maior taxa de positividade no grupo MGIT+FC sugere que o uso do filtrado pode aumentar a detecção de casos paucibacilares.

Esses resultados corroboram um estudo anterior que utilizou o filtrado de cultura de Mtb para cultivar uma biópsia de linfonodo que, de outra forma, foi negativa em todos os outros testes diagnósticos para TB (O'CONNOR et al., 2015).

A análise estatística revelou uma concordância significativa entre os dois métodos (Kappa = 0,857; p = 0,038), sugerindo que, embora distintos, MGIT+FC e MGIT tenham desempenhos semelhantes na identificação de Mtb (Tabela 3). Contudo, a sensibilidade superior do MGIT+FC sugere que ele pode ser uma ferramenta valiosa com forte relevância clínica (BELTRAN et al., 2020). O desempenho do MGIT+FC foi reforçado ainda mais por sua acurácia de 97,80%. A razão de verossimilhança positiva (RVP) de 45,58 indica que amostras positivas no MGIT+FC têm 45 vezes mais chances de conter Mtb, enquanto a razão de verossimilhança negativa (RVN) de 0,0255 sugere uma baixa probabilidade de resultados negativos serem falsos (Tabela 5).

Observou-se que o método MGIT+FC apresentou taxas de positividade mais altas em comparação aos demais métodos nos espécimes de fragmento de pulmão (41,66%), linfonodo (20%) e urina (23,07%). Esses resultados levantam a hipótese de que esses tipos de amostras contêm uma proporção mais elevada de bacilos em estado de dormência (Figura 3). Esse fenômeno pode estar associado às condições particulares enfrentadas pelos bacilos durante a infecção em cada um desses tecidos.

No pulmão, a formação de granulomas gera um ambiente de hipóxia, favorecendo o estado de dormência de Mtb (QUALLS; MURRAY, 2015). Nos linfonodos, a ação intensa do sistema imunológico cria um ambiente de estresse constante para os

bacilos (GANCHUA et al., 2020). Já em amostras de urina, o ambiente de pH ácido pode também induzir a dormência (WORCESTER et al., 2017). Esses fatores, que incluem hipóxia, resposta imunológica e variações de pH, são descritos na literatura como capazes de levar ao estado de dormência em Mtb (VOSKUIL et al., 2003), o que pode justificar as maiores taxas de positividade observadas com o uso do filtrado de cultura no método MGIT.

Até o momento, apenas um estudo publicado avaliou a suplementação do MGIT 960 com filtrado de cultura de Mtb (BELTRAN et al., 2022), onde o grupo controle detectou apenas 1 espécime (8,33%) contra 7 espécimes (58,3%) no meio suplementado, resultando em uma melhoria de 50% na taxa de positividade. Em comparação, o presente estudo analisou 245 espécimes clínicos, abrangendo uma maior variedade de amostras, o que reforça a eficácia do método suplementado.

Os resultados obtidos na análise do tempo de positividade revelaram que o grupo suplementado com filtrado de cultura (MGIT+FC) apresentou uma média de 18,68 dias, em comparação com 17,82 dias do grupo padrão MGIT (Tabela 9). Esses achados contrastam com o estudo de Beltran et al. (2022), que reportou uma diminuição significativa de 7 dias no tempo de positivação com o uso de filtrado de cultura. É importante considerar que a pesquisa de Beltran avaliou apenas 12 amostras, das quais somente uma apresentou positividade pelo MGIT sem filtrado. Essa singularidade na amostra pode não fornecer uma representação precisa do comportamento do teste, influenciando a média de positividade.

Além disso, enquanto a presente investigação incluiu uma diversidade de espécimes clínicos, abrangendo diferentes tipos de infecções tuberculosas (Tabela 2), o trabalho de Beltran et al., (2022) foi restrito a casos de meningoencefalite tuberculosa. Essa diferença na diversidade de amostras pode ser um fator crucial que explica as discrepâncias observadas nos tempos de positivação. A utilização de variados tipos de espécimes na análise pode ter introduzido variáveis que impactaram o tempo de detecção, refletindo a complexidade da infecção por Mtb em diferentes contextos clínicos.

Foi observado um aumento no número de contaminações nas culturas suplementadas com filtrado, com 17 contaminações registradas no MGIT+FC em comparação a 11 no MGIT (Tabela 3). Acreditamos que esse incremento nas contaminações pode estar associado a interações entre os componentes do filtrado e outras espécies bacterianas contaminantes. Apesar desse aumento nas

contaminações, o filtrado de cultura de Mtb demonstrou a capacidade de aumentar a positividade do teste (Tabela 3). No entanto, há uma necessidade crescente para o desenvolvimento de novas técnicas de descontaminação de espécimes, a fim de minimizar o risco de contaminação e melhorar a precisão dos resultados.

Os dados sugerem que o meio de cultura enriquecido com sobrenadante de cultura de Mtb (MGIT+FC) apresenta vantagens em relação ao meio de cultura padrão (MGIT), especialmente na detecção de micobactérias em amostras paucibacilares. O efeito estimulador do filtrado de cultura provavelmente resulta de uma combinação de fatores presentes no filtrado e não apenas dos fatores promotores de ressuscitação (GORDHAN et al., 2021).

Comparando o desempenho entre o Xpert MTB/RIF Ultra e MGIT+FC.

Em relação ao desempenho do MGIT+FC frente ao método molecular Xpert MTB/RIF Ultra, 37,20% dos espécimes positivos no Xpert também foram identificados como positivos no MGIT+FC (Tabela 6). A categoria "Very low" no Xpert apresentou uma taxa significativamente maior de detecção pelo MGIT+FC (30,20%), destacando a capacidade do meio enriquecido de identificar Mtb mesmo em amostras com baixos níveis de DNA bacteriano. Esse achado reforça a utilidade dos fatores de ressuscitação (FR) na melhoria da cultura de espécimes paucibacilares, onde os métodos moleculares podem apresentar limitações na detecção de DNA de Mtb em quantidades mínimas (KOHLI et al., 2018). A baixa detecção de maiores quantidades de DNA bacteriano pelo método molecular em categorias (Medium - 0%; High - 2,30%) reforça a natureza paucibacilar dos espécimes analisados.

Ao analisar os resultados classificados como "Traços", observou-se que 2,70% das amostras inicialmente consideradas negativas pelo MGIT+FC apresentaram traços de DNA bacteriano detectados pelo Xpert Ultra. Por outro lado, 2,30% das amostras positivas no MGIT+FC também foram categorizadas como "Traços" no Xpert (Tabela 6). A inclusão dessa categoria no Xpert Ultra visa identificar amostras com quantidades muito baixas de DNA bacteriano, que estão próximas ao limite de detecção do teste. No entanto, essa situação pode aumentar a probabilidade de resultados falso-positivos, tornando a interpretação clínica mais desafiadora (MAZZOLA et al., 2021). Além disso, 11,80% das amostras contaminadas no

MGIT+FC foram também identificadas como "Traços" pelo Xpert Ultra, evidenciando a complexidade associada à interpretação desses resultados.

Pesquisas recentes que avaliaram o teste Ultra em contextos de baixa prevalência de TB compararam sua sensibilidade e especificidade em relação à versão anterior, Xpert. Os autores concordam que o Ultra apresenta uma sensibilidade superior, especialmente em infecções paucibacilares, como a TB extrapulmonar (BISOGNIN et al., 2018; OPOTA et al., 2019; PIERSIMONI et al., 2019). No estudo de Opota et al., (2019), as leituras de traço foram registradas apenas em pacientes com TB ativa, embora a pesquisa tenha sido limitada por um pequeno número de participantes. Em outra investigação, 14 de 169 amostras (8,2%) identificadas como positivas pelo Ultra foram rotuladas como traço, sendo que 4 delas (28,6%) foram consideradas falso-positivas, corroboradas por resultados negativos em cultura e em amostras repetidas (PIERSIMONI et al., 2019). Esses achados destacam a incerteza clínica associada aos resultados de traço.

De acordo com as diretrizes da OMS, a interpretação clínica de resultados do teste Ultra que apresentem "Traços" deve ser considerada positiva nas seguintes situações: pacientes vivendo com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), crianças e amostras extrapulmonares (OMS, 2021). Assim, em conformidade com as recomendações da OMS, os resultados categorizados como "Traços" em amostras extrapulmonares, exceto em fragmentos de pulmão e lavados broncoalveolares, foram tratados como positivos.

Estudos prévios sobre a sensibilidade do Xpert Ultra em diferentes contextos clínicos corroboram esses resultados. Bouzouita et al. (2024), em uma investigação de amostras extrapulmonares, relataram uma sensibilidade de 80,66% e uma especificidade de 70,87%, sugerindo uma maior eficácia em amostras não respiratórias, embora ainda inferior à cultura em meio líquido. Sekyere e colaboradores, ao estudarem a sensibilidade do teste em uma área endêmica na África do Sul, encontraram resultados similares aos do presente estudo, com uma sensibilidade de 69,29% e especificidade de 49,25%, confirmando o desafio de diagnóstico em regiões com alta carga de doença e prevalência de formas paucibacilares (SEKYERE et al., 2021). Em contraste, uma pesquisa realizada em uma área de baixa prevalência na Itália reportou uma sensibilidade de 95,6% e especificidade de 97,5% (GIUDICE et al., 2021).

No entanto, a utilização do Xpert Ultra pode se mostrar valiosa em contextos onde culturas de MGIT estão contaminadas, uma vez que o teste molecular pode ajudar na confirmação da presença de Mtb, mesmo na ausência de crescimento bacteriano. Essa complementaridade entre os dois métodos pode aumentar a precisão do diagnóstico e melhorar o manejo clínico dos pacientes, especialmente em casos desafiadores (GHEBREKRISTOS et al., 2023).

Com base nos resultados, fica evidente a importância de explorar métodos adicionais para maximizar a detecção de Mtb, especialmente em amostras de difícil diagnóstico. A combinação de abordagens moleculares e de cultura pode fornecer uma estratégia eficaz para aprimorar a sensibilidade dos testes e, assim, contribuir para a identificação mais precisa dos casos de TB (GHEBREKRISTOS et al., 2023).

Desempenho da baciloscopia e meio de cultura à base de ovo para diagnóstico de amostras extrapulmonares.

A sensibilidade da baciloscopia no presente estudo foi de 13,9% (Tabela 8), um resultado significativamente inferior ao reportado por Sekyere et al. (2021), que encontraram uma sensibilidade de 53,85%, e por Alışkan et al. (2013), que relataram 50%. Wang et al. (2018) também observaram uma sensibilidade de 24,5%, evidenciando que a baciloscopia, como método diagnóstico, apresenta um desempenho insatisfatório em amostras paucibacilares. A alta especificidade observada na baciloscopia no presente estudo, que foi de 98,9%, é compatível com os resultados de Alışkan et al. (2013) e Sekyere et al. (2021), que relataram especificidades de 99,7% e 98,51%, respectivamente. Isso indica que, embora a baciloscopia tenha uma sensibilidade limitada, é um método confiável na exclusão da TB, apresentando poucos falsos positivos.

A cultura em meio à base de ovo revelou uma sensibilidade de 40% e uma especificidade de 91% (Tabela 8). Estes dados são consistentes com o estudo de Alışkan et al. (2013), que observaram uma sensibilidade de 50% e especificidade de 99,7%, e com Gülcan, Erbay e Genç (2019), que reportaram 60% de sensibilidade e 100% de especificidade. A sensibilidade moderada da cultura em meio à base de ovo sugere que, embora seja um método mais sensível que a baciloscopia, ainda pode apresentar limitações na detecção de casos de TB, especialmente em pacientes com baixa carga bacilar, como nos casos de espécimes extrapulmonares. Wang et al.

(2018) também relataram uma sensibilidade para a cultura em meio à base de ovo de 51,7% e especificidade de 100%, o que reforça a ideia de que a cultura em meio à base de ovo é uma opção superior à baciloscopia para a detecção de TB, especialmente em amostras com menor concentração de bacilos.

Ao comparar os dados de sensibilidade e especificidade da baciloscopia e da cultura em meio à base de ovo com os resultados de outros estudos, observa-se uma sensibilidade consideravelmente inferior na baciloscopia. Embora Wang et al. (2018) tenham encontrado uma sensibilidade de 24,5% e especificidade de 100% para a baciloscopia, esses resultados, mesmo que mais altos que os do presente estudo, continuam a ser considerados baixos para um teste diagnóstico. Em contrapartida, tanto a baciloscopia quanto a cultura em meio à base de ovo apresentam altas especificidades, reafirmando a utilidade desses métodos diagnósticos na identificação de casos de TB, mesmo em espécimes extrapulmonares e paucibacilares.

Por fim, ressalta-se que a adição do filtrado de cultura demonstrou aumentar significativamente a sensibilidade do MGIT. O método MGIT+FC apresentou sensibilidade de 97,50% e especificidade de 97,86%, resultados que se destacam em comparação ao Xpert MTB/RIF Ultra, ao meio à base de ovo e a baciloscopia. Esses dados indicam que o uso de FC representa uma abordagem promissora para aprimorar a precisão diagnóstica em amostras com baixa carga bacteriana, embora se observe um aumento na taxa de contaminação das culturas líquidas.

7. CONCLUSÃO

1) A adição do filtrado de cultura de Mtb ao sistema BACTEC MGIT 960 é capaz de aumentar a sensibilidade do teste ao identificar também as populações dormentes, que não cresceriam no meio convencional.

2) O filtrado de cultura aumenta a frequência de contaminação das culturas líquidas, sugerindo a necessidade de aperfeiçoamento de técnicas de descontaminação para este método.

3) O filtrado de cultura não afeta o tempo de positivação do BACTEC MGIT 960.

4) O Xpert MTB/RIF Ultra apresenta sensibilidade inferior quando comparado ao MGIT e MGIT suplementado com filtrado de cultura.

5) O fragmento de pleura foi o espécime clínico com a maior taxa de positivação pelos métodos Xpert MTB/RIF Ultra e BACTEC MGIT 960. Já o fragmento de pulmão foi o espécime com a maior taxa de positivação pelo MGIT suplementado com filtrado de cultura de Mtb.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALİŞKAN, H. E.; BOSTANOĞLU, E.; TURUNÇ, T; ÇOLAKOĞLU, Ş.; DEMİROĞLU, Y. Z.; KURŞUN, E. et al. Retrospektif olarak tüberküloz laboratuvarının altı yıllık sonuçları ve antimikobakteriyel ilaçlara direnç oranları. *Türk Toraks Dergisi*, v. 14, p. 53-58, 2013.

ALMEIDA JÚNIOR, P. S.; CASTELLANI, L. G. S.; PERES, R. L.; COMBADÃO, J.; TRISTÃO, T. C.; DIETZE, R. et al. Differentially culturable tubercle bacteria dynamics during standard anti-tuberculosis treatment: a prospective cohort study. *Tuberculosis*, v. 124, p. 101945, 2020.

BALABAN, N. Q.; HELAINE, S.; LEWIS, K.; ACKERMANN, M.; ALDRIDGE, B.; ANDERSSON, D. I. et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 7, p. 441-448, jul. 2019. DOI: 10.1038/s41579-019-0196-3.

BATYRSHINA, Y. R.; SCHWARTZ, Y. S. Modeling of *Mycobacterium tuberculosis* dormancy in bacterial cultures. *Tuberculosis*, v. 117, p. 7–17, 2019.

BELTRAN, C. G. G.; HEUNIS, T.; GALLANT, J.; VENTER, R.; DU PLESSIS, N.; LOXTON, A. G.; et al. Investigating non-sterilizing cure in TB patients at the end of successful anti-TB therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, p. 443, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00443.

BISOGNIN, F.; LOMBARDI, G.; LOMBARDO, D.; RE, M. C.; DAL MONTE, P. Improvement of Mycobacterium tuberculosis detection by Xpert MTB/RIF Ultra: a head-to-head comparison on Xpert-negative samples. *PLoS One*, v. 13, e0201934, 2018.

BONECA, I. G. The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, p. 46–53, 2005.

BOUZOUITA, I.; GHARIANI, A.; BEN DHAOU, K.; JEMAIEL, S.; ESSAALAH, L.; BEJAOUI, S.; et al. Usefulness of Xpert MTB/RIF Ultra for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis in Tunisia. *Scientific Reports*, v. 14, art. 2217, 2024.

BRAUNER, A.; FRIDMAN, O.; GEFEN, O.; BALABAN, N. Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, p. 320-330, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias*. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. *Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil*. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 364 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. *Manual de recomendações para o diagnóstico laboratorial de tuberculose e micobactérias não tuberculosas de interesse em saúde pública no Brasil*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022. 492 p.

BETTS, J. C.; LUKEY, P. T.; ROBB, L. C.; McADAM, R. A.; DUNCAN, K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Molecular Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 717-731, 2002.

BRUNETTI, M. N. *Metodização do isolamento e análise do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das populações ressuscitáveis e metabolicamente ativas de Mycobacterium tuberculosis***.** 2021. 109 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2021. Disponível em: https://sappg.ufes.br/tese_drupal//tese_15511_Disserta%E7%E3o_Manuela.pdf. Acesso em: 25 set. 2024.

CARRANZA, C.; PEDRAZA-SANCHEZ, S.; DE OYARZABAL-MENDEZ, E.; TORRES, M. Diagnosis for Latent Tuberculosis Infection: New Alternatives. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 2006, 2020.

CHAKRAVORTY, A. M.; SIMMONS, M.; ROWNEKI, H.; PARMAR, Y.; CAO, J.; RYAN, J. The New Xpert MTB/RIF Ultra: Improving Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Resistance to Rifampin in an Assay Suitable for Point-of-Care Testing. *MBio*, v. 8, p. e00812-17, 2017.

CHENGALROYEN, M. D.; BEUDES, G. M.; GORDHAN, B. G.; STREICHER, E. M.; CHURCHYARD, G.; HAFNER, R.et al. Detection and quantification of differentially culturable tubercle bacteria in sputum from tuberculosis patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 194, n. 12, p. 1532-1540, 2016.

DANIEL, O. J.; BAMIDELE, J. O.; ALABI, A. D.; TIJANI, M. A.; AKINLEYE, C. A.; ORITOGUN, K. S.; SOYINKA, F. O. et al. The effect of the Covid-19 pandemic on Tuberculosis (TB) case notification in Ogun State, Nigeria. *African Health Sciences*, v. 23, n. 3, p. 376-383, set. 2023.

DAFFÉ, M.; MARRAKCHI, H. Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope. *Microbiology Spectrum*, v. 6, n. 3, p. GPP3-0027, jun. 2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018. Disponível em: https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018.

DARTOIS, V. A.; RUBIN, E. J. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, p. 685–701, 2022.

DEL GIUDICE, A.; PERNA, R.; BALDONI, T.; SCARANO, F.; DE ROSA, A.; PONTARELLI, A. et al. Evaluation of Xpert MTB/RIF Ultra for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a retrospective analysis in a low-tuberculosis prevalence setting. *Journal of Tuberculosis Research*, v. 9, n. 3, p. 143-152, 2021.

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

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

DORMAN, S. E.; SCHUMACHER, S. G.; ALLAND, D.; NABETA, P.; ARMSTRONG, D. T.; KING, B. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 18, n. 1, p. 76-84, jan. 2018. DOI: 10.1007/s10096-019-03634-8.

FISKE, C. T.; GRIFFIN, M. R.; HOLT, E.; WARKENTIN, J.; KALTENBACH, L.; ARBOGAST, P. G. et al. Black race, sex, and extrapulmonary tuberculosis risk: an observational study. *BMC Medicine*, v. 10, n. 16, 2010.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, v. 19, p. 93-129, 2001.

GANCHUA, S. K. C.; WHITE, A. G.; KLEIN, E. C.; FLYNN, J. L. Lymph nodes-The neglected battlefield in tuberculosis. *PLoS Pathogens*, v. 16, n. 8, e1008632, 2020. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008632.

GETAHUN, H.; MATTEELLI, A.; CHAISSON, R. E.; RAVIGLIONE, M. Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *New England Journal of Medicine*, v. 372, n. 22, p. 2127-2135, 28 maio 2015. DOI: 10.1056/NEJMra1405427.

GHEBREKRISTOS, Y. T.; BEYLIS, N.; CENTNER, C. M.; VENTER, R.; DERENDINGER, B.; TSHIVHULA, H.; et al. Xpert MTB/RIF Ultra on contaminated liquid cultures for tuberculosis and rifampicin-resistance detection: a diagnostic accuracy evaluation. *Articles*, v. 4, n. 10, p. E822-E829, out. 2023.

GLOBAL TUBERCULOSIS PROGRAMME. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children, 2013.

GOPALASWAMY, R.; DUSTHACKEER, V. N.; KANNAYAN, S.; SUBBIAN, S. Extrapulmonary Tuberculosis—An Update on the Diagnosis, Treatment and Drug Resistance. *Journal of Respiratory Medicine*, v. 1, p. 141-164, 2021.

GÜLCAN, A.; ERBAY, Ü. T.; GENÇ, Ö. Akciğer ve akciğer dışı tüberkülozda Xpert MTB/RIF testinin tanısal performansının değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cem Dergisi*, v. 49, n. 4, p. 197-205, 2019. DOI: 10.5222/TMCD.2019.197.

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

HERNANDEZ-PANDO, R.; JEYANATHAN, M.; MENGISTU, G.; AGUILAR, D.; OROZCO, H.; HARBOE, M. et al. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet*, v. 356, n. 9248, p. 2133-2138, 2000.

HOUBEN, R. M. G. J.; DODD, P. J. The global burden of latent tuberculosis infection: a re-estimation using mathematical modelling. *PLoS Medicine*, v. 13, n. 10, e1002152, 2016. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002152.

HUANG, F.; XIA, Y.; CHEN, H.; WANG, N.; DU, X.; CHEN, W. et al. The impact of the COVID-19 epidemic on tuberculosis control in China. *Lancet Regional Health - Western Pacific*, v. 3, p. 100032, out. 2020. DOI: 10.1016/j.lanwpc.2020.100032.

JACKSON, M. The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 4, n. 10, a021105, 2014. DOI: 10.1101/cshperspect.a021105.

JARVIS, B.; WILRICH, C.; WILRICH, P.-T. Reconsideration of the derivation of most probable numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, n. 2, p. 1250-1260, 2010.

KANA, B. D.; GORDHAN, B. G.; DOWNING, K. J.; SUNG, N.; VOSTROKTUNOVA, G.; MACHOWSKI, E. E. et al. The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Molecular Microbiology*, v. 67, n. 3, p. 672-684, 2008.

KAPRELYANTS, A. S.; MUKAMOLOVA, G. V.; RUGGIERO, A.; MAKAROV, V. A.; DEMINA, G. R.; SHLEEVA, M. O. et al. Resuscitation-promoting factors (Rpf): in search of inhibitors. *Protein and Peptide Letters*, v. 19, n. 10, p. 1026-1034, out. 2012.

KARKHANIS, V. S.; JOSHI, J. M. Pleural effusion: diagnosis, treatment, and management. *Open Access Emerg Med*, v. 4, p. 31-52, 2012. DOI: 10.2147/OAEM.S29942.

KOHLI, M.; SCHILLER, I.; DENDUKURI, N.; YAO, M.; DHEDA, K.; DENKINGER, C. M. et al. Xpert MTB/RIF Ultra and Xpert MTB/RIF assays for extrapulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. Cochrane Database of Systematic *Reviews*, v. 2021, n. 1, p. Art. No.: CD012768, 2021. DOI: 10.1002/14651858.CD012768.pub3.

LAENAERTS, A; BARRY III, C. E.; DARTOIS, V. Heterogeneity in tuberculosis pathology, microenvironments and therapeutic responses. *Immunological Reviews*, v. 264, n. 1, p. 288-307, mar. 2015.

LIMA, T. M.; BELOTTI, N. C. U.; NARDI, S. M. T.; PEDRO, H. S. P. Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose. *Rev Pan-Amaz Saude*, v. 8, n. 2, p. 67-78, 2017. DOI: 10.5123/S2176-62232017000200008.

LIPWORTH, S.; HAMMOND, R. J.; BARON, V. O.; HU, Y.; COATES, A.; GILLESPIE, S. H. Defining dormancy in mycobacterial disease. *Tuberculosis (Edinb*), v. 99, p. 131-142, jul. 2016.

LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE (LPSN). Mycobacterium. Disponível em: https://lpsn.dsmz.de/genus/mycobacterium. Acesso em: 29 ago. 2024.

MCNALLY, E.; ROSS, C.; GLEESON, L. E. The tuberculous pleural effusion. *Breathe (Sheff)*, v. 19, p. 230143, 2023.

MUKAMOLOVA, G. V.; TURAPOV, O.; MALKIN, J.; WOLTAMNN, G.; BARER, M. R. Resuscitation-promoting factors reveal an occult population of tubercle bacilli in sputum. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*., v. 181, p. 174–180, 2010.

NAMBIAR, R.; CHATELLIER, S.; BEREKSI, N.; VAN BELKUM, A.; SINGH, N.; BARUA, B.; et al. Evaluation of Mycotube, a modified version of Lowenstein-Jensen (LJ) medium, for efficient recovery of Mycobacterium tuberculosis (MTB). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*., v. 36, p. 1981–1988, 2017.

NIDOI, J.; SEMAKULA, D.; MUGOYA, I. K.; ADATU, F. E.; BWIRE, G. M.; NANTEZA, M.; et al. Impact of socio-economic factors on tuberculosis treatment outcomes in north-eastern Uganda: a mixed methods study. *BMC Public Health*, v. 21, p. 2167, 2021.

NIKITUSHKIN, V. D.; DEMINA, G. R.; SHLEEVA, M. O.; KAPRELYANTS, A. S. Peptidoglycan fragments stimulate resuscitation of “non-culturable” mycobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 103, n. 1, p. 37–46, 2013.

NOUSSAIR, L.; BERT, F.; LEFLON-GUIBOUT, V.; GAYET, N.; NICOLAS-CHANOINE, M. H. Early diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by a new procedure combining broth culture and PCR. *J. Clin. Microbiol*., v. 47, p. 1452–1457, 2009.

O'CONNOR, B. D.; WOLTMANN, G.; PATEL, H.; TURAPOV, O.; HALDAR, P.; MUKAMOLOVA, G. V. Can resuscitation-promoting factors be used to improve culture rates of extra-pulmonary tuberculosis? *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 19, n. 12, p. 1556-1557, dez. 2015.

OLIVER, J. D. The public health significance of viable but non-culturable bacteria. In: COLWELL, R. R.; GRIMES, D. J. Nonculturable Microorganisms in the Environment. *ASM Press*, p. 277-300, 2000.

OPOTA, O.; ZAKHAM, F.; MAZZA-STALDER, J.; NICOD, L.; GREUB, G.; JATON, K. Added value of Xpert MTB/RIF Ultra for diagnosis of pulmonary tuberculosis in a low-prevalence setting. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 57, n. 2, e01717–e01718, 30 jan. 2019.

NUERMBERGER, E.; BISHAI, W. R.; GROSSET, J. H. Latent tuberculosis infection. *Semin. Respir. Crit. Care Med*., v. 25, p. 317–336, 2004.

PAI, M.; DENKINGE, C. M.; KIK, S. V.; RANGAKA, M. X.; ZWERLING, A.; OXLADE, O. et al. Gamma interferon release assays for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. Clin. Microbiol. Rev., v. 27, p. 3–20, 2014.

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

PANTOJA, A.; KIK, S. V.; DENKINGE, C. M. Costs of novel tuberculosis diagnostics – will countries be able to afford it? J. Infect. Dis., v. 211, Suppl. 2, p. S67–S77, 2015.

PARTE, A. C.; SARDÀ CARBASSE, J.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; REIMER, L. C.; GÖKER, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 70, n. 11, p. 5607-5612, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004332. Epub 2020 jul. 23.

PEDDIREDDY, V.; DODDAM, S. N.; AHMED, N. Mycobacterial dormancy systems and host responses in tuberculosis. *Front. Immunol.*, v. 8, art. 84, 2017.

PIERSIMONI, C.; GHERARDI, G.; GRACCIOTTI, N.; POCOGNOLI, A. Comparative evaluation of Xpert MTB/RIF and the new Xpert MTB/RIF Ultra with respiratory and extra-pulmonary specimens for tuberculosis case detection in a low incidence setting. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, v. 15, 100094, 2019.

PRAKASHA, S.; RAMA, S.; SURESH, G.; D'SA, I. P.; SHETTY, S. S.; KUMAR, S. G. Mapping the pattern and trends of extrapulmonary tuberculosis. *Journal of Global Infectious Diseases*, v. 5, n. 2, p. 54-59, 2013. DOI: 10.4103/0974-777X.112277.

QUALLS, J. E.; MURRAY, P. J. Immunometabolism within the tuberculosis granuloma: amino acids, hypoxia, and cellular respiration. *Seminars in Immunopathology*, v. 38, n. 2, p. 139-152, 2016. DOI: 10.1007/s00281-015-0534-0.

RIOJAS, M. A.; McGOUGH, K. J.; RIDER-RIOJAS, C. J.; RASTOGI, N.; HAZBÓN, M. H. Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 68, n. 1, p. 243-250, jan. 2018. DOI: 10.1099/ijsem.0.002507.

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

ROSSER, A.; STOVER, C.; MANISH, P.; MUKAMOLOVA, G. V. Resuscitation-promoting factors are important determinants of the pathophysiology in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Crit Rev Microbiol*, v. 17, p. 1-10, 2017.

ROSSMAN, M. D.; MACGREGOR, R. Introduction and brief history. 1. ed. Philadelphia: McGraw-Hill, 1995.

RUSSEL-GOLDMAN, E.; XU, J.; WANG, X.; CHAN, J.; TUFARIELLO, J. M. A *Mycobacterium tuberculosis* Rpf double-knockout strain exhibits profound defects in reactivation from chronic tuberculosis and innate immunity phenotypes. *Infect Immun*, v. 76, n. 9, p. 4269-4281, 2008.

SEKYERE, J. O.; MAPHALALA, N.; MALINGA, L. A.; MBELLE, N. M.; MANINGI, N. A comparative evaluation of the new GeneXpert MTB/RIF Ultra and other rapid diagnostic assays for detecting tuberculosis in pulmonary and extra pulmonary specimens. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 16587, 2019.

SHLEEVA, M.; KUDYKINA, Y.; VOSTROKNUTOVA, G.; SUZINA, N.; MULYUKIN, A.; KAPRELYANTS, A. S. Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* are formed in response to gradual external acidification. *Tuberculosis*, v. 91, p. 146–154, 2011.

SHLEEVA, M.; GONCHARENKO, A.; KUDYKINA, Y.; YOUNG, D.; YOUNG, M.; KAPRELYANTS, A. Cyclic AMP-dependent resuscitation of dormant mycobacteria by exogenous free fatty acids. *PLoS One*, v. 8, n. 12, e82914, 2013.

SHLEEVA, M.; KONDRATIEVA, T. K.; DEMINA, G. R.; RUBAKOVA, E. I.; GONCHARENKO, A. V.; APT, A. S. et al. Overexpression of adenylyl cyclase encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* Rv2212 gene confers improved fitness,

accelerated recovery from dormancy and enhanced virulence in mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, art. 370, 2017.

SIDDIQI, H. S.; RÜSCH-GERDES, S. MGIT procedure manual. Foundation for Innovative New Diagnostics, 2006.

SUN, L. M.; LIU, H. M.; YE, Y. Q.; LEI, Y.; ISLAM, R.; TAN, S. M. et al. Smart nanoparticles for cancer therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.*, v. 8, p. 28, 2023.

TUFARIELLO, J. M.; JACOBS, W. R.; CHAN, J. Individual *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth in vitro and in vivo. *Infect. Immun.*, v. 72, p. 515–526, 2004.

TURAPOV, O.; WADDELL, S. J.; BURKE, B.; GLENN, S.; SARYBAEVA, A. A.; TUDO, G. et al. Antimicrobial treatment improves mycobacterial survival in nonpermissive growth conditions. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 58, n. 5, p. 2798-2806, 2014.

VOSKUIL, M. I.; SCHNAPPINGER, D.; VISCONTI, K. C.; HARRELL, M. I.; DOLGANOV, G. M.; SHERMAN, D. R. et al. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J. Exp. Med.*, v. 198, p. 705–713, 2003.

WANG, G.; DONG, W.; LAN, T.; FAN, J.; TANG, K.; LI, Y.; et al. Diagnostic accuracy evaluation of the conventional and molecular tests for spinal tuberculosis in a cohort, head-to-head study. *Emerging Microbes & Infections*, v. 7, p. 1-9, 2018.

WAYNE, L. G.; HAYES, L. G. An in vitro model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun.*, v. 64, n. 6, p. 2062-2069, 1996.

WAYNE, L. G.; SOHASKEY, C. D. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Microbiol.*, v. 55, p. 139-163, 2001.

WORCESTER, E. M.; BERGSLAND, K. J.; GILLEN, D. L.; COE, F. L. Mechanism for higher urine pH in normal women compared with men. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, v. 314, n. 4, p. F623-F629, 2018. DOI: 10.1152/ajprenal.00494.2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global tuberculosis report 2023. Genebra: OMS, 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Meeting Report of a Technical Expert Consultation: Noninferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF, WHO Rep., 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Consolidated guidelines on tuberculosis: Module 3: Diagnosis—Rapid diagnostics for tuberculosis detection 2021 update. Geneva: World Health Organization, 2021.

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

WU, X. C.; TAN, G.; GAO, R.; YAO, L.; BI, D.; GUO, Y.; YU, F.; FAN, L. Assessment of the Xpert MTB/RIF Ultra assay on rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Int J Infect Dis.*, v. 81, p. 91-96, 2019. doi: 10.1016/j.ijid.2019.01.050. Epub 2019 Feb 7.

XIE, Z.; SIDDIGI, N.; RUBIN, E. J. Differential antibiotic susceptibilities of starved Mycobacterium tuberculosis isolates. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 49, n. 11, p. 4778-4780, 2005.

YANG, Z.; KONG, Y.; WILSON, F.; FOXMAN, B.; FOWLER, A. H.; MARRS, C. F.; CAVE, M. D.; BATES, J. H. Identification of risk factors for extrapulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis.*, v. 38, n. 2, p. 199-205, 2004.

ZHANG, M.; XUE, M.; HE, Q. J. Diagnostic accuracy of the new Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculosis disease: A preliminary systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.*, v. 90, p. 35-45, 2020.

ZHANG, Y.; YANG, Y.; WOODS, A.; COTTER, R. J.; SUN, Z. Resuscitation of dormant Mycobacterium tuberculosis by phospholipids or specific peptides. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 284, n. 2, p. 542-547, 2001.

APÊNDICE A – Análise de Qui-Quadrado da distribuição dos resultados do MGIT de acordo com o tipo de espécime clínico.

	MGIT			
	Negativo	**Positivo**	**Contaminado**	**p**
		n (%)		
Fragmento mama	10 (5.20)	0 (0.00)	1 (9.10)	
Fragmento pleura	16 (8.20)	9 (22.50)	0 (0.00)	
Fragmento pulmão	13 (6.70)	4 (10.00)	2 (18.20)	
Lavado broncoalveolar	15 (7.70)	2 (5.00)	1 (9.10)	
Lavado gástrico	14 (7.20)	3 (7.50)	0 (0.00)	0,566
LCR	16 (8.20)	1 (2.50)	1 (9.10)	
Linfonodo	9 (4.60)	1 (2.50)	1 (9.10)	
Líquido ascítico	8 (4.10)	1 (2.50)	0 (0.00)	
Líquido pleural	46 (23.70)	12 (30.00)	3 (27.30)	
Urina	13 (6.70)	2 (5.00)	1 (9.10)	
Outros	34 (17.50)	5 (12.50)	1 (9.10)	
Total	194 (100.0)	40 (100.0)	11 (100.0)	

O apêndice A apresenta a distribuição dos resultados do MGIT em relação ao tipo de espécime clínico. Os líquidos pleurais destacam-se com a maior taxa de positividade (30%) e contaminação (27,3%). Além disso, os fragmentos pleurais apresentaram uma taxa positiva de 22,5%. Por outro lado, a maioria dos resultados negativos foi observada em líquidos pleurais (23,7%) e em amostras classificadas como "Outros" (17,5%). As análises estatísticas não mostraram significância (p=0,566), indicando que não há associação estatisticamente relevante entre o tipo de espécime e os resultados obtidos.

APÊNDICE B – Análise de Qui-Quadrado da distribuição dos resultados do MGIT+FC de acordo com o tipo de espécime clínico.

	MGIT+FC			
	Negativo	**Positivo**	**Contaminado**	**p**
		n (%)		
Fragmento mama	9 (4.90)	0 (0.00)	2 (11.80)	
Fragmento pleura	16 (8.60)	9 (20.90)	0 (0.00)	
Fragmento pulmão	12 (6.50)	5 (11.60)	2 (11.80)	
Lavado broncoalveolar	16 (8.60)	2 (4.70)	0 (0.00)	
Lavado gástrico	14 (7.60)	3 (7.00)	0 (0.00)	0,243
Líquor	16 (8.60)	1 (2.30)	1 (5.90)	
Linfonodo	8 (4.30)	2 (4.70)	1 (5.90)	
Líquido ascítico	8 (4.30)	1 (2.30)	0 (0.00)	
Líquido pleural	45 (24.30)	12 (27.90)	4 (23.50)	
Urina	10 (5.40)	3 (7.00)	3 (17.60)	
Outros	31 (16.80)	5 (10.30)	4 (23.50)	
Total	185 (100.0)	43 (100.0)	17 (100.0)	

O apêndice B apresenta a distribuição dos resultados do MGIT+FC em relação ao tipo de espécime clínico. Os líquidos pleurais mostraram a maior taxa de positividade (27,9%) e também lideraram em resultados negativos (24,3%). Fragmentos pleurais foram o segundo grupo mais positivo, com 20,9%. A contaminação foi mais frequente em urina (17,6%) e líquidos pleurais (23,5%). As análises estatísticas não revelaram significância (p=0,243), indicando que não há associação estatisticamente relevante entre o tipo de espécime e os resultados obtidos.

APÊNDICE C – Análise de Qui-Quadrado da distribuição dos resultados do Xpert MTB/RIF Ultra por tipo de espécime clínico.

	Xpert MTB/RIF Ultra							
	Negativo	**Traços**	**Very low**	**Low**	**Medium**	**High**	**N realizado**	**p**
				n (%)				
Frag. mama	9 (5.1)	0 (0.00)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (6.5)	
Frag. pleura	12 (6.7)	3 (37.5)	5 (31.2)	3 (27.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (6.5)	
Frag. pulmão	15 (8.4)	0 (0.00)	1 (6.2)	1 (9.1)	0 (0.0)	1 (100.0)	1 (3.2)	
Lav. broncoalv.	11 (6.2)	0 (0.00)	1 (6.2)	2 (18.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (12.9)	
Lav. gástrico	9 (5.1)	0 (0.00)	2 (12.5)	1 (9.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (16.1)	0,051
LCR	16 (9.0)	0 (0.00)	0 (0.0)	1 (9.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (3.2)	
Linfonodo	11 (6.2)	0 (0.00)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Líq. ascítico	7 (3.9)	0 (0.00)	1 (6.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (3.2)	
Líq. pleural	46 (25.8)	4 (50.0)	5 (31.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (19.4)	
Urina	9 (5.1)	1 (12.5)	0 (0.0)	1 (9.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (16.1)	
Outros	33 (18.5)	0 (0.00)	1 (6.2)	2 (18.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (12.9)	
Total	178 (100)	8 (100)	16 (100)	11 (100)	0 (100)	1 (100)	31 (100)	

Entre os espécimes analisados pelo Xpert Ultra (Apêndice C), o líquido pleural apresentou a maior taxa de resultados positivos, com 31,2% na categoria “Very low”. Fragmentos pleurais também se destacaram, apresentando a mesma taxa de 31,2% nessa categoria. Em contraste, os fragmentos de mama não mostraram resultados positivos. Os demais espécimes analisados tiveram poucos casos de positivação pelo Xpert Ultra. A análise estatística indica um p=0,051, sugerindo que há uma tendência, embora não estatisticamente significativa, na variação dos resultados de acordo com o tipo de espécime.

APÊNDICE D – Análise de Qui-Quadrado dos resultados da baciloscopia de acordo com o tipo de espécime clínico.

	Baciloscopia			
	Negativo	**Positivo**	**Não Realizado**	**p**
		n (%)		
Fragmento mama	11 (5.10)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Fragmento pleura	22 (10.30)	2 (28.6)	1 (4.20)	
Fragmento pulmão	15 (7.00)	1 (14.30)	3 (12.50)	
Lavado broncoalveolar	15 (7.00)	0 (0.00)	3 (12.50)	
Lavado gástrico	7 (3.30)	1 (14.30)	9 (37.50)	p<0,001*
LCR	17 (7.90)	1 (14.30)	0 (0.00)	
Linfonodo	11 (5.10)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Líquido asctico	9 (4.20)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Líquido pleural	59 (27.60)	1 (14.30)	1 (4.20)	
Urina	16 (7.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Outros	32 (15.00)	1 (14.30)	7 (29.20)	
Total	214 (100.0)	7 (100.0)	24 (100.0)	

A análise dos resultados da baciloscopia (Apêndice D) mostrou uma diferença significativa entre os tipos de espécimes clínicos ($p < 0,001$). A maior proporção de positividade foi observada em fragmentos pleurais, com 28,6% de resultados positivos. Fragmentos pulmonares, lavado gástrico e líquor apresentaram positividade em 14,3% dos casos. A maioria dos espécimes, incluindo fragmentos de mama, linfonodo, urina e líquido ascítico, apresentou resultados negativos, sem nenhum caso de positividade registrado.

APÊNDICE E – Análise de Qui-Quadrado dos resultados da cultura em meio à base de ovo de acordo com o tipo de espécime clínico.

	Meio à base de ovo							
			n(%)					
Código Amostra	**Negativo**	**<20 colôn**	**+**	**++**	**+++**	**Contamin.**	**Não reali.**	**p**
Frag. mama	9 (4.69)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Frag. pleura	18 (9.38)	5 (45.45)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (10.00)	0 (0.00)	
Frag. pulmão	13 (6.77)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	4 (20.00)	0 (0.00)	
Lav. broncoal.	14 (7.29)	1 (9.09)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (10.00)	0 (0.00)	
Lav. gástrico	15 (7.81)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (10.00)	0 (0.00)	0,002*
LCR	15 (7.81)	1 (9.09)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (5.00)	0 (0.00)	
Linfonodo	8 (4.17)	0 (0.00)	1 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (100.00)	
Líq. ascitico	9 (4.69)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Líq. pleural	50 (26.04)	2 (18.18)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	4 (20.00)	1 (100.00)	
Urina	11 (5.73)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (5.00)	0 (0.00)	
Outros	30 (15.63)	2 (18.18)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	4 (20.00)	0 (0.00)	
Total	192	11	1	0	0	20	2	

A análise de Qui-quadrado mostrou uma associação significativa entre o tipo de espécime clínico e os resultados da cultura em meio à base de ovo (p=0,002) (Apêndice E). Entre os resultados mais relevantes, 45,45% dos fragmentos pleurais foram negativos, com 10% apresentando contaminação. Espécimes de líquido pleural e do grupo "Outros" mostraram 18,18% de positividade para menos de 20 colônias e 20% de contaminação. No geral, 12 amostras foram positivas, com a maioria apresentando menos de 20 colônias, enquanto a contaminação foi mais frequente em fragmentos pulmonares e outros espécimes.