

Moisés Palaci¹

Ensaios clínicos de novas drogas e testes diagnósticos em tuberculose: Desafios micobacteriológicos

Clinical trials of new tuberculosis drugs and diagnostic tests: Mycobacteriological challenges

Desde que a Organização Mundial de Saúde declarou a da tuberculose (TB) como emergência global em 1993, esta doença, historicamente importante e igualmente negligenciada, vem recebendo mais atenção por parte das agências dedicadas ao seu controlo e ao financiamento de pesquisas. Como consequência deste facto e do desenvolvimento científico e tecnológico alcançado nos últimos anos, novos testes diagnósticos e compostos com potencial terapêuticos têm surgido e obrigado os fabricantes e *sites* de pesquisa clínica a avaliá-los para serem registados em agências regulatórias. Em ensaios clínicos para avaliação de novas drogas, a principal metodologia utilizada é a atividade bactericida precoce (*early bactericidal activity* – EBA) descrita por Mitchison¹, que consiste em quantificar a carga bacilar (CFU) presente em amostras de escarro recolhidas por um período de 12 horas durante os primeiros 7 dias de tratamento. Tal metodologia é baseada no facto de a redução do número de CFU

Since the World Health Organization's 1993 declaration that tuberculosis (TB) was a worldwide emergency, this historically important and equally neglected disease has received more attention from agencies dedicated to its controlling and financing research. As a consequence of this and of recent scientific and technological advances, new diagnostic tests and compounds with therapeutic potential have emerged. These have obliged manufacturers and clinical research sites to evaluate and register them in regulatory bodies. The main methodology used in clinical trials to evaluate new drugs is early bactericidal activity (EBA), described by Mitchison¹, which consists of quantifying the colony forming unit (CFU) in sputum samples collected over a 12-h period for the first 7 days of treatment.

This methodology is based on the reduction in the number of CFU over the first two days being statistically related to the efficacy of the treatment regimens instituted, making it a

¹ Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil/*Infectious Diseases Unit, Universidade Federal do Espírito Santo, Brazil*
e-mail: mpalaci@ndi.ufes.br

durante os primeiros dois dias estar estatisticamente relacionada com a eficácia dos esquemas terapêuticos empregues e representa um parâmetro clínico de redução da infeciosidade^{2,3}. Os estudos de EBA são realizados para comparar a atividade de várias doses de uma droga, diferentes drogas dentro da mesma classe e diferentes classes de drogas⁴. A realização deste tipo de ensaio clínico requer elevado investimento financeiro, profissionais qualificados em boas práticas clínicas e laboratoriais e um sério comprometimento e compreensão dos doentes. Diante destes factos, o laboratório de micobacteriologia assume grande responsabilidade e enfrenta muitos desafios para cumprir com êxito o seu papel nos ensaios clínicos. A seguir são descritos resumidamente alguns dos obstáculos e estudos realizados para superá-los.

Recolha de amostras 12 a 16 horas

Um *pool* de escarro recolhido nestas condições requer internação do doente, o seu distanciamento da família, custo financeiro de internação, maior risco de contaminação da cultura e longo período de tempo para monitoramento. Com o objetivo de verificar se o *pool* de escarro recolhido durante 5 horas pela manhã poderia conter uma carga bacilar semelhante ao *pool* recolhido num período de 12 horas, Nascimento *et al* (estudo em fase final), ao comparar a carga bacilar em amostras de escarro de doentes com tuberculose pulmonar, recolhidas por períodos de 5 e 12 horas, não observaram diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos avaliados (6,88 log₁₀ CFU/ml, e 6,95 log₁₀ CFU/ml, respectivamente) e demonstraram assim que uma recolha monitorizada de es-

clinical parameter of reduced infectiousness^{2,3}. EBA studies are performed to compare the activity of various doses of a drug, different drugs of the same class and different classes of drugs⁴. This type of clinical trial implies heavy financial investment, professionals qualified in good clinical and laboratory practices and a serious commitment to and understanding of patients. Accordingly, the mycobacteriology laboratory faces heavy responsibility and a series of challenges to be able to play a successful role in clinical trials. Some of the obstacles encountered and studies undertaken to overcome them are summarised below.

Sample collection over 12 and 16 hrs

Collecting a pool of sputum under these conditions requires the patient being admitted to the hospital, which involves separation of the patient from his/her family, the costs of hospitalization stay, an increased risk of culture contamination and increased length of patient monitoring. To see if a pool of sputum collected over 5-h in the morning contained similar CFU to a pool collected over a 12-h period, Nascimento *et al*. (study currently in final stage) when comparing CFU in the sputum of patients with pulmonary TB collected over 5-h and 12-h periods, did not find any statistically significant differences in the two groups evaluated (6.88 log₁₀ CFU/ml *vs.* 6.95 log₁₀ CFU/ml, respectively) and, thus, showed that sputum collected over 5-h could be used in future clinical trials.

New markers of bacteriological clearance in response to anti-tuberculosis therapy

Microbiological parameters can easily be assessed in spontaneously expectorated spu-

carro durante 5 horas poderá ser utilizada em futuros ensaios clínicos.

Novos marcadores de depuração bacteriológica em resposta à terapia antituberculose

Os parâmetros microbiológicos podem ser facilmente avaliados na expectoração espontânea, mas a cultura quantitativa é demorada e trabalhosa. O marcador ideal mediria eventos no decurso do início do tratamento e seria rigoroso, independentemente da ação ou do regime a ser testado. Recentemente, Liwen *et al.*⁵ avaliaram e reportaram níveis de mRNA por RT-PCR quantitativa em amostras recolhidas de doentes com TB sob monoterapia, num anterior estudo de atividade bactericida em fluoroquinolonas, e nos que estavam sob um regime-padrão com base em rifampina num ensaio de IL-2. Os autores demonstraram que o mensageiro RNA para a isocitrato liase da enzima do ciclo glioxilato teve taxas de declínio semelhantes em doentes a receberem monoterapia com isoniazida, gatifloxicina, levofloxacina e moxifloxacina. A isocitrato liase (*icl*) mRNA esteve altamente relacionada com as unidades que formavam colónias na expectoração antes da terapia e durante 7 dias de monoterapia em todos os grupos de tratamento. Detectou-se *icl* mRNA na expectoração de doentes com cultura positiva de TB em regime de tratamento com base em rifampina durante 2 meses. Além disso, também demonstraram que a proteína de ligação à fibronectina (*fbpB*) mRNA diminuiu 0,47 \log_{10} moléculas/ml/d desde o início até ao segundo dia, o único mRNA que se relacionou com a atividade bactericida precoce da monoterapia com isoniazida. Em conclusão,

but quantitative culture is time consuming and labour intensive. The ideal marker would measure events early during treatment and be accurate regardless of the drug action or regimen being tested. Recently, Liwen *et al.*⁵ assessed and reported mRNA levels by quantitative RT-PCR in sputum specimens from TB patients receiving monotherapy in an early bactericidal activity study of fluoroquinolones and in those receiving a standard rifampin-based regimen in an IL-2 trial. These authors demonstrated that messenger RNA for the glyoxylate cycle enzyme isocitrate lyase declined at similar rates in patients receiving isoniazid, gatifloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin monotherapy. Isocitrate lyase (*icl*) mRNA correlated highly with CFU in sputum prior to therapy and during 7 days of monotherapy in all treatment arms. *icl* mRNA was detectable in sputum of culture-positive TB patients receiving a rifampin-based regimen for 2 months. In addition, they also demonstrated that fibronectin-binding protein (*fbpB*) mRNA decreased 0.47 \log_{10} molecules/ml/d from baseline to day 2, the only mRNA correlating with the early bactericidal activity of isoniazid monotherapy. In conclusion, *icl* and *fbpB* mRNAs are reliable markers of *M. tuberculosis* viability, however, both of these uses will require larger longitudinal studies to validate the reliability of *icl* mRNA as a surrogate marker of response to drug therapy for TB.

Lower rates of contamination of mycobacterial culture

In clinical trials to evaluate treatment regimens that require patient follow-up for up to 2 years after cure, and in studies to eva-

icl e fbpB mRNAs são marcadores fiáveis de viabilidade do *M. tuberculosis*; no entanto, estas duas utilizações carecem de estudos longitudinais mais extensos que validem a fiabilidade de icl mRNA como marcador substituto de resposta à terapia farmacológica para TB.

Diminuição das taxas de contaminação de culturas de micobactérias

Em ensaios clínicos para avaliação de regimes terapêuticos que exigem o monitoramento do doente em até dois anos após a sua cura, e em estudos para avaliação de novos testes diagnósticos, culturas de escarro contaminadas podem causar prejuízos económicos, eliminação de dados da análise estatística (*time points* onde ocorreram contaminação) ou até a exclusão do doente do estudo. Diante destas situações problemáticas, Peres *et al.* (artigo submetido a publicação) realizaram um ensaio clínico pragmático para avaliar a eficácia de métodos de antisepsia intrabucal na redução da taxa de contaminação de culturas de doentes suspeitos de tuberculose. Os autores constataram que, dentre os três procedimentos de higienização bucais utilizados isoladamente (somente água, digluconato de clorexidina e cloreto de cetilpiridínio), apenas o realizado como digluconato de clorexidina permitiu uma redução significativa da taxa de contaminação das culturas, sobretudo no meio líquido MGIT (Becton Dickinson). Verificaram ainda que o uso de uma concentração maior do antimicrobiano PANTA (PANTA 2x) nas amostras-controlo dos doentes reduziu significativamente a população de organismos contaminantes no meio MGIT, sem, contudo, reduzir a taxa de deteção do *M. tuberculosis*.

ulate new diagnostic tests, contaminated sputum cultures could result in high costs, elimination of data from the statistical analysis (time points where contamination occurred) or even exclusion of the patient from the study. In the face of these difficulties, Peres *et al.* (article submitted for publication) performed a pragmatic clinical trial to evaluate the efficacy of methods of intra-oral antiseptics in reducing the contamination rate of cultures from patients suspected of TB. The authors found that of the three intra-oral hygiene procedures employed separately (water only; chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride), only the one using chlorhexidine digluconate resulted in a significant reduction of the culture contamination rate, particularly in MGIT liquid medium (Becton Dickinson). They also found that using a higher concentration of PANTA antimicrobial solution (PANTA 2x) in patients' control samples, significantly reduced the population of contaminating organisms in the MGIT liquid medium, without, however, lowering the rate of *M. tuberculosis* detection.

Sputum sample division

Performing clinical trials to evaluate new diagnostic methods and treatments often requires sputum sample division for comparative analysis. In this case, the samples must be divided equally, maintaining a similar CFU in each part. The use of a mucolytic agent is recommended for this, but there are no studies proving its efficacy or that of other procedures for sample division. Moraes *et al.* (unpublished data) used a quantitative culture technique to verify if CFU was similar in divided samples after the di-

Divisão em amostras de escarro

A realização de ensaios clínicos para avaliação de novos métodos diagnósticos e terapêuticos frequentemente requer a divisão da amostra de escarro para análise comparativa. Neste caso é necessário que a divisão da amostra ocorra de maneira equitativa, mantendo a carga bacilar semelhante entre as partes. Recomenda-se o uso de um agente mucolítico para esta finalidade; contudo, por não se dispor de estudos que comprovem a eficiência deste ou de outros procedimentos de divisão de amostras, Morais *et al* (dados ainda não publicados), utilizando técnica de cultura quantitativa, propuseram-se verificar se após a digestão de amostras escarro por procedimento químico (N-acetil-L-cisteína 50 mg/ml- 10% do volume da amostra durante 15 minutos), ou mecânico (agitação com pérolas de vidro), a carga bacilar seria semelhante nas amostras divididas. Ao comparar os resultados dos grupos entre si não observaram diferenças estatísticas significativas. Para o primeiro grupo que fez uso imediato do NALC foi observada na alíquota I uma média de 5,66 ($\pm 0,92$) \log_{10} , enquanto na alíquota II 5,65 ($\pm 0,94$) \log_{10} UFC/ml. Para o segundo grupo, processado com pérolas de vidro, foi observado uma média de 5,53 ($\pm 0,91$) e 5,49 ($\pm 0,94$) \log_{10} UFC/ml em cada alíquota, respectivamente, demonstrando assim que tanto o procedimento químico quanto o físico podem ser utilizados com igual eficiência para divisão de amostras de escarro.

Como destacado anteriormente, os ensaios clínicos terapêuticos em tuberculose são complexos e onerosos. Poucos *sites* no mundo possuem os requisitos e equipas necessárias à sua realização. Se considerarmos o modesto investimento feito nesta área, importantes avanços ocorreram nos últimos anos. Entretanto, muitos outros desafios

gestion of sputum samples by chemical procedure (N-Acetyl-L-Cysteine 50mg/ml- 10% of the sample volume for 15 minutes), or mechanically (agitation with glass beads). No statistically significant differences were seen when the results of the groups were compared. In the first group (NALC), aliquot I had mean 5.66 (± 0.92) \log_{10} and aliquot II mean 5.65 (± 0.94) \log_{10} CFU/ml. In the second group (glass beads) the means were 5.53 (± 0.91) and 5.49 (± 0.94) \log_{10} CFU/ml for each aliquot, respectively, thus showing that both chemical and physical procedures can be used with equal efficacy for division of sputum samples.

As mentioned above, clinical treatment trials for TB are complex and expensive. Few sites worldwide have the necessary requirements and teams to perform them. If we consider the modest investment made in this area, important advances have been seen in recent years. There are, however, many challenges which have yet to be met. One such challenge is the validation of the results described above and the development of simple tests able to determine sensitivity to drugs for latent bacteria and bacterial viability over the long course of TB treatment.

ainda necessitam de ser superados. Dentre os quais a validação dos resultados descritos e o desenvolvimento de testes simples e capazes de determinar a sensibilidade a drogas de bactérias em fase de latência e a viabilidade bacteriana durante o longo período de tratamento da tuberculose.

Bibliografia/Bibliography

1. Mitchison DA. Assessment of new sterilizing drugs for treating pulmonary tuberculosis by culture at 2 months. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1062-1063.
2. Jindani A, Aber VR, Edwards EA, Mitchison DA. The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121:939-949.
3. Kennedy N, Fox R, Kisyombe GM, Saruni AOS, Uiso LO, Ramsay ARC, Ngowi FI, Gillespie S. Early bactericidal and sterilizing activities of ciprofloxacin in pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:1547-1551.
4. Johnson JL, Hadad DJ, Boom WH, Daley CL, Peloquin CA, Eisenach KD, Jankus DD, Debanne SM, Charlebois ED, Maciel E, Palaci M, Dietze R. Early and extended early bactericidal activity of levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10:605-612.
5. Li L, Mahan CS, Palaci M, Horter L, Loeffelholz L, Johnson JL, Dietze R, Debanne SM, Joloba ML, Okwera A, Boom WH, Eisenach KD. Sputum *Mycobacterium tuberculosis* mRNA as a marker of bacteriologic clearance in response to anti-tuberculosis therapy. *J Clin Microbiol* 2009; 18 [Epub ahead of print].