



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e da Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 10 2013 001898-8 A2

(22) Data de Depósito: 25/01/2013
(43) Data da Publicação: 09/09/2014
(RPI 2279)



(51) Int.Cl.:
C12Q 1/68

(54) Título: MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS RESISTENTES DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS E KIT DE DIAGNÓSTICO/PROGNÓSTICO DE TUBERCULOSE

(73) Titular(es): Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEEPS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul

(72) Inventor(es): Arnaldo Zaha , Harrison Magdiner Gomes, Maria Lucia Rosa Rosetti, Márcia Susana Nunes Silva , Philip Noel Suffys, Raquel de Abreu Maschmann, Márcia Susana Nunes Silva

(57) Resumo: MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS RESISTENTES DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS E KIT DE DIAGNÓSTICO/PROGNÓSTICO DE TUBERCULOSE. A presente invenção relata método e kit para identificação de cepas de tuberculose, especialmente aquelas resistentes aos fármacos como, por exemplo, isoniazida e rifampicina com leitura colorimétrica.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS RESISTENTES DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E KIT DE DIAGNÓSTICO/PROGNÓSTICO DE TUBERCULOSE

5

Campo da Invenção

A presente invenção relata método e kit para identificação de cepas de tuberculose, especialmente aquelas resistentes aos fármacos como, por exemplo, isoniazida (INH) e rifampicina (RMP). A presente invenção se situa no campo da Farmacologia, Química, Farmácia e da Medicina de uma maneira geral.

10

Antecedentes da Invenção

A tuberculose é uma doença das mais antigas conhecidas da humanidade. Ela é transmitida pelo *Mycobacterium tuberculosis* e sua propagação se dá pelo ar. A infecção pelo *M. tuberculosis* se inicia quando o bacilo atinge os alvéolos pulmonares e pode se espalhar para os nódulos linfáticos e daí, através da corrente sanguínea para tecidos mais distantes onde a doença pode se desenvolver: a parte superior dos pulmões, os rins, o cérebro e os ossos.

15

A resposta imunológica do organismo mata a maioria dos bacilos, levando à formação de um granuloma. Os "tubérculos", ou nódulos de tuberculose são pequenas lesões que consistem em tecidos mortos de cor acinzentada contendo a bactéria da tuberculose.

20

A tuberculose resistente é transmitida da mesma forma que as formas sensíveis a medicamentos. A resistência primária se desenvolve em pessoas infectadas inicialmente com microorganismos resistentes. A resistência secundária (ou adquirida) surge quando a terapia contra a tuberculose é inadequada ou quando não se segue ou se interrompe o regime de tratamento

25

prescrito.

30

Os índices de infecção de *M. tuberculosis* e o posterior desenvolvimento da tuberculose, mata anualmente cerca de 2,5 milhões de pessoas. Sem um controle muito mais eficaz, cerca de 1.5 bilhão de pessoas serão infectadas e 3.5 milhões morrerão de tuberculose até 2020. O Brasil é, segundo dados de 5 2010 do Ministério da Saúde, o 19º país com maior número de casos da doença. Cerca de 73% dos novos casos são curados, 12% a menos do preconizado pela OMS.

Os testes moleculares disponíveis no mercado são importados, têm custos elevados, são de alta complexidade e muitos não são validados do 10 Brasil. Atualmente, existem no mercado alguns testes para detecção de tuberculose (descritos a seguir), entretanto nenhum deles compreende as características da presente invenção, com sondas novas e únicas e com padronização utilizando informações da população brasileira; técnica de fácil execução, rápida (máximo de 8 h) podendo ser utilizada em laboratórios de 15 análises clínicas, dispensando aparelhos sofisticados e de custo elevado.

Os testes atualmente no mercado são:

1) INNO-LiPA Rif TB - Innogenetics N.V., Ghent, Belgica.

O INNO-LiPA Rif TB é um método que também se baseia na análise de genoma e no princípio da hibridização de fase sólida reversa, onde o produto 20 amplificado da cultura do *M. tuberculosis* ou amostra clínica é hibridizado com sondas específicas imobilizadas em uma membrana de nitrocelulose. Essas sondas abrangem uma região de 157pb do gene *rpoB* do *M. tuberculosis* e o resultado é visualizado através de sinais que aparecem na membrana depois de uma reação enzimática colorimétrica. O teste contém cinco sondas do tipo 25 selvagem e quatro sondas para mutações específicas no gene *rpoB*. A interpretação do padrão de bandas permite a identificação do complexo *M. tuberculosis* e a detecção das mutações no gene *rpoB*. O teste proposto aqui tem mais sondas com sequencias diferentes e, além de detectar a resistência a rifampicina, também detecta resistência a isoniazida, e pode ser realizado em 30 outros suportes sólidos que não é membrana. Este método já foi testado em membranas, microplacas e *beads*. Além disso, todas as reações até o

desenvolvimento de cor acontecem em fase líquida. Também a forma de leitura do resultado é diferente. No teste comercial o resultado é visual, pois mostra ou não um sinal na membrana. No método proposto o resultado é através de leitura de absorbância da solução líquida que quanto mais corada maior a absorbância.

2) GENOTYPE MTBDR*plus* - Hain Lifescience, Nehren, Alemanha

Este teste é uma nova versão do citado anteriormente, onde foi introduzido ao teste a região promotora do gene *inhA* para testar o nível baixo de resistência à INH e foi denominado GenoType MTBDR*plus*. O procedimento completo para detecção da resistência à RMP e INH envolve três passos: extração do DNA, uma amplificação multiplex com *primers* biotinilados e uma hibridização reversa em membranas de náilon. Além de sondas mutadas, o teste apresenta um controle do conjugado, para documentar a eficiência da ligação do conjugado e da reação do substrato; um controle de amplificação, para garantir que o teste foi executado de forma correta e sem a existência de inibidores de amplificação no DNA; um controle de locus (*rpoB*, *katG*, *inhA*) e um controle para o complexo *M. tuberculosis*. Na nossa proposta, a fase de extração de DNA é realizada junto com o restante do teste e por resinas. Além disso a sequência das sondas são diferentes pois foram construídas por este grupo e também o suporte utilizado por eles é membrana de náilon e, no teste apresentado aqui, o suporte apesar de sólido foi testado em microplaca e *beads*. Além disso, o restante da reação até o desenvolvimento da cor acontece entre reagentes em fase líquida. No caso do MTDR*plus* a cor é precipitada na membrana. O resultado é obtido de forma diferente. Ver o que está já descrito para o INNOLIPA.

3) XPERT ® MTB Cepheid - Innovative New Diagnostics (IND) e da Universidade de Medicina e Odontologia de New Jersey (UMDNJ)

O teste detecta, simultaneamente, a presença da tuberculose e a resistência a RMP, um marcador confiável de substituição de linhagens que são multirresistente (MDR-TB). A metodologia envolve o uso de três *primers*

específicos e 5 sondas moleculares para garantir especificidade, além de confirmar casos de baciloscopia positiva e negativa.

No âmbito patentário não foram encontrados documentos relevantes para a presente invenção. Alguns dos documentos também citam sondas e métodos de detecção e diagnóstico/prognóstico de tuberculose (por exemplo, EP 129022, WO 2009/143565, US 2009/0104602, WO 2007/140545, WO 06/125973). Entretanto, nenhum deles utiliza as mesmas sondas, método e kit da presente invenção.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção relata um método e kit para identificação de cepas de tuberculose, especialmente aquelas resistentes aos fármacos como, por exemplo, isoniazida (INH) e rifampicina (RMP).

Portanto, a invenção vem resolver o problema de detecção e identificação de cepas de *M. tuberculosis*, principalmente aquelas com resistência a fármacos. A presente invenção também proporciona um kit de diagnóstico/prognóstico de tuberculose e de efeitos dos fármacos a serem utilizados no paciente com tuberculose, indicando que, no caso de resistência a certos fármacos, outros fármacos devem ser indicados para o paciente.

É portanto, um objeto da presente invenção um método de identificação de cepas de *M. tuberculosis* compreendendo as etapas de:

- a) obtenção de material biológico;
- b) processamento do material obtido em a);
- c) hibridização do material de a) com qualquer uma das sondas específicas descritas em SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3, SEQ N4, SEQ N5, SEQ N6, SEQ N7, SEQ N8, SEQ N9, SEQ N10, SEQ N11, SEQ N12, SEQ N13, SEQ N14, SEQ N15;

d) detecção das sondas hibridizadas com o material biológico de a) em meio líquido e leitura colorimétrica.

Em uma realização preferencial, a obtenção do material biológico compreende a extração do DNA.

5 Em uma realização preferencial, o processamento do material obtido (alvo) compreende a amplificação do material biológico por PCR.

Em uma realização preferencial, a hibridização dos produtos amplificados a uma sonda específica imobilizada é realizada em suporte sólido com hibridização em meio líquido e leitura colorimétrica.

10 Em uma realização preferencial, a detecção do produto amplificado é realizada através de uma coloração em meio líquido.

É um objeto da presente invenção um kit de diagnóstico de tuberculose compreendendo:

a) meios para contactar o material biológico obtido com qualquer 15 uma sondas descritas em SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3, SEQ N4, SEQ N5, SEQ N6, SEQ N7, SEQ N8, SEQ N9, SEQ N10, SEQ N11, SEQ N12, SEQ N13, SEQ N14, SEQ N15;

b) meios para verificar se houve hibridização entre o material biológico e a sonda.

20 É um objeto adicional da presente invenção um kit de prognóstico de tuberculose compreendendo:

a) meios para contactar o material biológico obtido com qualquer uma das sondas descritas em SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3, SEQ N4, SEQ N5, SEQ N6, SEQ N7, SEQ N8, SEQ N9, SEQ N10, SEQ N11, SEQ N12, SEQ 25 N13, SEQ N14, SEQ N15;

b) meios para verificar se houve hibridização entre o material biológico e a sonda;

c) quando houver hibridização, indicar ao paciente o prognóstico de resistência ao tratamento com os fármacos isoniazida (INH) e rifampicina 30 (RMP).

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados

pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Descrição Detalhada da Invenção

5 Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar o escopo da mesma.

Sondas para identificação/deteccção de cepas de *M. tuberculosis*

10 É, portanto, um objeto da presente invenção o uso das sondas para identificação/deteccção de cepas de *M. tuberculosis* compreendendo as seqüências SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3, SEQ N4, SEQ N5, SEQ N6, SEQ N7, SEQ N8, SEQ N9, SEQ N10, SEQ N11, SEQ N12, SEQ N13, SEQ N14, SEQ N15.

Método de identificação/deteccção de cepas de *M. tuberculosis*

15 É um objeto adicional da presente invenção um método de identificação de cepas de *M. tuberculosis* compreendendo as etapas de:

- a) obtenção de material biológico;
- b) processamento do material obtido em a);
- c) hibridização do material de a) com qualquer uma das sondas específicas descritas em SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3, SEQ N4, SEQ N5, SEQ N6, SEQ N7, SEQ N8, SEQ N9, SEQ N10, SEQ N11, SEQ N12, SEQ N13, SEQ N14, SEQ N15;
- d) deteccção das sondas hibridizadas com o material biológico de a).

25 Em uma realização preferencial, a obtenção do material biológico compreende a extração do DNA.

Em uma realização preferencial, o processamento do material obtido (alvo) compreende a amplificação do material biológico por PCR.

30 Em uma realização preferencial, a hibridização dos produtos amplificados a uma sonda específica imobilizada é realizada em suporte sólido.

Em uma realização preferencial, a deteccção do produto amplificado é

realizada através de uma coloração em meio líquido.

Kit de diagnóstico de tuberculose

É um objeto da presente invenção um kit de diagnóstico de tuberculose
5 compreendendo:

a) meios para contactar o material biológico obtido com qualquer
uma das sondas descritas em SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3, SEQ N4, SEQ N5,
SEQ N6, SEQ N7, SEQ N8, SEQ N9, SEQ N10, SEQ N11, SEQ N12, SEQ
N13, SEQ N14, SEQ N15;

10 b) meios para verificar se houve hibridização entre o material
biológico e a sonda.

Kit de prognóstico de tuberculose

É um objeto adicional da presente invenção um kit de prognóstico de
15 tuberculose compreendendo:

a) meios para contactar o material biológico obtido com qualquer
uma sondas descritas em SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3, SEQ N4, SEQ N5, SEQ
N6, SEQ N7, SEQ N8, SEQ N9, SEQ N10, SEQ N11, SEQ N12, SEQ N13,
SEQ N14, SEQ N15;

20 b) meios para verificar se houve hibridização entre o material
biológico e a sonda;

c) quando houver hibridização, indicar ao paciente o prognóstico
de resistência ao tratamento com os fármacos isoniazida (INH) e rifampicina
(RMP).

25

Exemplo 1. Realização Preferencial

O teste consiste em um kit molecular colorimétrico para detectar cepas
de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos isoniazida (INH) e rifampicina
(RMP) através da utilização de uma PCR multiplex para amplificar os genes e
30 detecção colorimétrica destes em um suporte sólido como uma microplaca com
leitura espectrofotométrica. Resumidamente, os DNA de *M. tuberculosis* das

amostras clínicas foram extraídas e as amostras respiratórias foram tratadas previamente com o método N-acetyl-L-cysteine-NaOH. Após, centrifugadas por 10 min e retirado o sobrenadante. Neste, adicionou-se 100 µL de tampão de lise (Gu.HCl 8,0 M, Tris HCl 0,08 M, EDTA 0,040 M, Triton X-100 2%). Os sobrenadantes foram homogeneizados em vórtex e colocados a 100°C por 10 min e centrifugadas por 1 min. Novamente, os sobrenadantes foram retirados, e estes colocados em tubos previamente preparados com 2,5 µL de resina (SiO₂). O sobrenadante foi retirado e descartado. O pellet foi lavado com 200 µL de Solução de Lavagem (Gu.HCl 8,0M, Tris HCl 0,080M) por duas vezes. Após, adicionou-se 200 µL de Etanol 70°, centrifugados por 1 min e retirado o sobrenadante. Os tubos foram fechados e colocados a 56°C por 10 min. Posteriormente, foram abertos os tubos e mantidos à temperatura ambiente por 5 min. Adicionou-se 33 µL de TE 1X em cada tubo, homogeneizados em vórtex e colocados por 10 min a 56°C. Após, os tubos foram centrifugados por 1 min e retirados os sobrenadantes (30 µL). Estes foram transferidos para tubos novos de 0,5 mL, previamente identificados com o número da amostra e data.

Para a reação de PCR, utilizou-se a seqüência de inserção IS6110, usada como marcador para o complexo *M. tuberculosis*, foi amplificada utilizando os *primers* IS1 (5'-CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC-3') e IS2 (5'-BIO- GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA-3'), como descrito por Hermans *et al.* (1990). Os *primers* utilizados para reação da PCR multiplex para verificar as mutações características da resistência foram: Rif1 (5'-GGT CGC CGC GAT CAA GGA GT-3') e Rif2 (5'-Bio-TGC ACG TCG CGG ACC TCC A-3') utilizados para amplificar uma região de 157 pb do gene *rpoB*. Para o gene *katG* os *primers* utilizados foram katG1 (5'-CAT GAA CGA CGT CGA AAC AG-3') e katG2 (5'-Bio-CGA GGA AAC TGT TGT CCC AT-3') que amplificam uma região de 232 pb do gene e os *primers* inhA1 (5'-CCT CGC TGC CCA GAA AGG GA-3') e inhA2 (5'-Bio-ATC CCC CGG TTT CCT CCG GT-3') amplificam uma região de 248 pb do gene *inhA* regulatório. Parte da seqüência de inserção IS6110 foi amplificada utilizando os *primers* IS1 (5'-CGT GAG GGC

ATC GAG GTG GC-3') e IS2 (5'-BIO- GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA-3'), do qual amplificam uma região de 245 pb.

A reação de PCR multiplex foi feita em um volume final de 50 μ L contendo 200 μ M de cada dNTP, 10 mM Tris-HCL (pH 8), 50 mM KCL, 2 mM MgCL₂, 10 pmoles de cada *primer* (Rif1/Rif2, *katG1/katG2*, *inhA1/inhA2*, IS1/IS2), 2.5 U de *Taq* DNA polimerase (Cebiot, UFRGS, Brasil). Para amplificação de DNA extraído das amostras clínicas a reação de PCR foi realizada em um termociclador automático (MiniCycler™, M.J. Research Inc) utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguido de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 65°C por 1 min e extensão de 72°C por 1,5 min, totalizando 40 ciclos. Após a conclusão dos 30 ciclos, realizou-se uma nova extensão a 72°C por 4 min. Um total de 15 sondas para *screening* dos genótipos selvagem e mutado mais frequentes foram utilizados como a tabela abaixo:

15

Lista com as sondas que quando construídas são aminadas na extremidade 5'

Oligo	Seqüência de Nucleotídeos (5' a 3')	pb	Tipo
Rif1	CAGCCAGCTGAGCCAATTCAT	21	Selvagem
Rif2	TTCATGGACCAGAACAACCC	20	Selvagem
Rif3	CGCTGTCTGGGGTTGACC	17	Selvagem
Rif4	TTGACCCACAAGCGCCGACT	20	Selvagem
Rif5	CTGTCTGGCGCTGGGGC	16	Selvagem
Rif2m	CCAATTCATGG <u>TCC</u> CAGAA	21	Mutante
Rif4ma	GTTGACCT <u>TACA</u> AAGCGCCG	18	Mutante
Rif4mb	GGTTGACCG <u>GACA</u> AAGCGCC	18	Mutante
Rif5ma	CTG <u>TTGG</u> CGCTGGGGC	16	Mutante
Rif5mb	C <u>ACTGTGGG</u> CGCTGG	16	Mutante
IS	T ₉ GCCCCGTCCCGCCGATCTC	18	Selvagem
KatG wt	TCA CCA GCG GCA TCG AG	17	Selvagem
katG	TCA CCA <u>CCG</u> GCA TCG AG	17	Mutante

mut			
inhA wt	CGGCGAGACGATAGGTTGTC	20	Selvagem
inhA	CGGCGAG <u>AT</u> GATAGGTTGTC	20	Mutante
mut			

Códons marcados: posição do códon onde ocorre mais freqüentemente as mutações.

As sondas com um grupo 5'-amino terminal foram fixadas no suporte sólido, uma separada da outra em uma microplaca. A hibridização entre os produtos de PCR e as sondas foi realizada em fase líquida na temperatura de 62°C por 45 min. Nesta fase, adicionou-se o conjugado específico da enzima para a ligação na biotina do *primer*. O sinal de hibridização foi visualizado após a adição do substrato, ocorrendo a formação de uma coloração, quando houver correspondência perfeita entre a sonda e o produto de PCR. O resultado desta reação colorimétrica foi quantificado em um espectrofotômetro (450 nm) para leitura de absorbância. No método INNOLIPA o resultado é visual.

Foram testadas diferentes concentrações para os oligonucleotídeos: 0,1 pmol/μL, 0,5 pmol/μL, 1,0 pmol/μL, 1,5 pmol/μL e 2,0 pmol/μL. Foram realizados vários testes com diferentes temperaturas de hibridização: 50°C, 55°C, 60°C, 62°C e 65°C. Também foram realizados testes com várias concentrações (SSC 1,0X, 0,5X e 0,2X) e temperaturas (24°C, 57°C e 60°C) para as lavagens. Foram também testadas hibridizações com 5 μL, 10 μL e 20 μL de produto de PCR. Com os melhores resultados obtidos nos testes acima foi construído e melhorado o protocolo de hibridização colorimétrico.

A caracterização de sensibilidade ou resistência da bactéria é obtida através do padrão de hibridização do produto de PCR com os oligonucleotídeos fixados em um suporte sólido, sendo a hibridização detectada através de um sistema enzimático que se desenvolve em fase líquida e onde a coloração é medida em um espectrofotômetro. Esse sistema utiliza um conjugado que se liga na biotina presente no *primer* do produto amplificado. A reação positiva é desenvolvida pela adição do seu substrato. O

resultado dessa reação é a formação de uma coloração que deve ser medida através de sua absorbância. Se o isolado for resistente, a hibridização não deverá ocorrer com todos os oligonucleotídeos presentes no suporte, apenas irá hibridizar com os oligonucleotídeos quando a seqüência corresponder à

5 mutação responsável pela resistência. O teste baseia-se em quatro processos principais: a extração do DNA, a amplificação do alvo por PCR, a hibridização dos produtos amplificados a uma sonda específica imobilizada no suporte sólido e a detecção do produto amplificado através de uma coloração em meio líquido. Um total de 15 sondas para *screening* dos genótipos selvagem e

10 mutado mais freqüentes são fixadas no suporte. A seqüência de inserção IS6110 é usada como marcador para o complexo *M. tuberculosis* com *primers* que geram um produto de 245 pb. Para a PCR multiplex, os *primers* que detectam mutações características da resistência a RMP amplificam uma região de 157pb do gene *rpoB* e no caso da INH, amplificam um fragmento de

15 232pb e 248pb do gene *katG* e região regulatória do *inhA*, respectivamente.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outros variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

**MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS RESISTENTES DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS E KIT DE DIAGNÓSTICO/PROGNÓSTICO
DE TUBERCULOSE**

5

1. Método de identificação de cepas de *M. tuberculosis* **caracterizado** por compreender as etapas de:

- a) obtenção de material biológico;
- 10 b) processamento do material obtido em a);
- c) hibridização do material de a) com qualquer uma das sondas específicas descritas em SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3, SEQ N4, SEQ N5, SEQ N6, SEQ N7, SEQ N8, SEQ N9, SEQ N10, SEQ N11, SEQ N12, SEQ N13, SEQ N14, SEQ N15;
- 15 d) detecção das sondas hibridizadas com o material biológico de a).

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela obtenção do material biológico compreender a extração do DNA.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo
20 processamento do material obtido (alvo) compreender a amplificação do material biológico por PCR.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela hibridização dos produtos amplificados a uma sonda específica imobilizada ser realizada em suporte sólido.

25 5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela detecção do produto amplificado ser realizada através de uma coloração em meio líquido.

6. Kit de diagnóstico de tuberculose **caracterizado** por compreender:

- a) meios para contactar o material biológico obtido com qualquer
30 uma sondas descritas em SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3, SEQ N4, SEQ N5, SEQ

N6, SEQ N7, SEQ N8, SEQ N9, SEQ N10, SEQ N11, SEQ N12, SEQ N13, SEQ N14, SEQ N15;

b) meios para verificar se houve hibridização entre o material biológico e a sonda.

5 7. Kit de prognóstico de tuberculose **caracterizado** por compreender:

a) meios para contactar o material biológico obtido com qualquer uma das sondas descritas em SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3, SEQ N4, SEQ N5, SEQ N6, SEQ N7, SEQ N8, SEQ N9, SEQ N10, SEQ N11, SEQ N12, SEQ N13, SEQ N14, SEQ N15;

10 b) meios para verificar se houve hibridização entre o material biológico e a sonda;

c) quando houver hibridização, indicar ao paciente o prognóstico de resistência ao tratamento com os fármacos isoniazida (INH) e rifampicina (RMP).

15

Resumo

**MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS RESISTENTES DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS E KIT DE DIAGNÓSTICO/PROGNÓSTICO
DE TUBERCULOSE**

5

A presente invenção relata método e kit para identificação de cepas de tuberculose, especialmente aquelas resistentes aos fármacos como, por exemplo, isoniazida e rifampicina com leitura colorimétrica.