

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DETECÇÃO DA MUTAÇÃO MAIS FREQUENTE NO
CÓDON 315 DO GENE *katG* RELACIONADA COM A
RESISTÊNCIA À ISONIAZIDA EM ISOLADOS DE
Mycobacterium tuberculosis

MIRELA VERZA

Porto Alegre, julho de 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Mirela Verza

DETECÇÃO DA MUTAÇÃO MAIS FREQUENTE NO
CÓDON 315 DO GENE *katG* RELACIONADA COM A
RESISTÊNCIA À ISONIAZIDA EM ISOLADOS DE

Mycobacterium tuberculosis

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e
Molecular da UFRGS como
requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Maria Lúcia Rosa Rossetti

Co-Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre, julho de 2008.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) com apoio financeiro da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Financiadora de estudo e projetos (FINEP) e da Rede-TB.

DESIDERATA

(Texto apócrifo, encontrado em uma catedral americana no século XVII)

Siga tranqüilamente, entre a inquietude e a pressa, lembrando-se que há sempre paz no silêncio.

Tanto quanto possível, sem humilhar-se viva em harmonia com todos os que o cercam. Fale a sua verdade mansa e claramente, e ouça a dos outros, mesmo a dos insensatos e ignorantes, eles também têm sua própria história.

Evite as pessoas agressivas e transtornadas, elas afligem o nosso espírito. Se você se comparar com os outros, você se tornará presunçoso e magoado, pois haverá sempre alguém inferior e alguém superior a você.

Você é filho do universo, irmão das estrelas e árvores, você merece estar aqui; e mesmo que você não possa perceber, a Terra e o Universo vão cumprindo o seu destino.

Viva intensamente o que já pôde realizar. Mantenha-se interessado em seu trabalho, ainda que humilde, ele é o que de real existe ao longo de todo o tempo.

Seja cauteloso nos negócios, porque o mundo está cheio de astúcia, mas não caia na descrença, a virtude existirá sempre.

Muita gente luta por altos ideais, em toda parte a vida está cheia de heroísmo.

Seja você mesmo, principalmente não simule afeição nem seja descrente do amor, porque mesmo diante de tanta aridez e desencanto ele é tão perene quanto a relva.

Aceite com carinho o conselho dos mais velhos, mas também seja compreensivo aos impulsos inovadores da juventude, alimente a força do espírito que o protegerá no infortúnio inesperado; mas não se desespere com perigos imaginários, muitos temores nascem do cansaço e da solidão.

E a despeito de uma disciplina rigorosa seja gentil consigo mesmo.

Portanto esteja em paz com Deus, como quer que você o conceba e quaisquer que sejam os seus trabalhos e aspirações, da fatigante jornada pela vida, mantenha-se em paz com sua própria alma. Acima da falsidade, do desencanto e agruras, o mundo ainda é bonito.

Seja prudente.

FAÇA TUDO PARA SER FELIZ.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Maria Lúcia Rossetti meu eterno agradecimento pela oportunidade, confiança e acima de tudo pelos ensinamentos, pelo carinho e dedicação na orientação deste trabalho.

Ao Dr. Arnaldo Zaha pela co-orientação e grande ajuda na realização deste trabalho. Muito obrigada pela confiança e oportunidade.

À FEPPS, em especial ao CDCT e ao Laboratório de Bacteriologia da Tuberculose (Martinha), pela oportunidade de realização deste trabalho.

A todas as colegas e amigas do CDCT pelo excelente convívio, amizade, solidariedade e por ofertarem todo o suporte e estímulo na conquista dos meus objetivos neste trabalho. Adoro vocês!!

Ao grupo de resistência; às colegas Elis e Lili pela ajuda com o seqüenciamento e pela amizade. Em especial à Márcia, que sempre esteve presente com constante auxílio e sugestões, obrigada pelo carinho e amizade. À colega, amiga e “mentora” Racka pelos ensinamentos, pela parceria na bancada, pelas caminhadas na Redenção com a “Sara”. Obrigada pela cumplicidade, amizade e carinho. Nada disso teria acontecido senão fosse por você!

À Luluzinha (achou que eu ia esquecer de ti?), sem palavras. Valeu, mesmo!

Às colegas e amigas Cristine e Sabrina pela ajuda com a análise estatística.

À colega e amiga Lia, muito obrigada pelas valiosas sugestões.

A nossa “manager” da sala geral Regina, excelente profissional e ser humano. Você é um grande exemplo de dedicação!

À dedicada estagiária Karen, muito obrigada pelo auxílio e amizade.

À Frã e Pati pelos momentos de descontração, incentivo e amizade.

Aos secretários do PPGBCM, Silvia Regina Centeno (Mimosa) e Luciano Saucedo, pelo grande auxílio sempre com muita dedicação e bom humor.

As minhas amigas e vizinhas Verginia e Renata pelos maravilhosos momentos de descontração.

Aos meus amigos, que compreenderam os momentos de minha ausência e pelo carinho constante.

A minha família, em especial meus queridos pais, principalmente, por tudo; pelo incentivo e amor durante toda minha vida.

Ao meu amado “namorado” Eloisio, pelo companherismo, compreensão e amor sempre presentes desde o início desta caminhada. Obrigada por estar sempre ao meu lado ajudando a encarar as dificuldades. Amo você!

A todos que de alguma maneira e em algum momento contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“O que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida”.

William Shakespeare

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 9 |
| LISTA DE FIGURAS | 12 |
| LISTA DE TABELAS | 13 |
| RESUMO..... | 14 |
| ABSTRACT | 15 |
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 TUBERCULOSE – MAGNITUDE DA DOENÇA..... | 16 |
| 1.1.1 Um Breve Histórico | 17 |
| 1.1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 19 |
| 1.1.3 Características Gerais da Doença..... | 21 |
| 1.1.4 Transmissão..... | 22 |
| 1.1.5 Imunologia e Associação TB/HIV | 23 |
| 1.1.6 Diagnóstico..... | 24 |
| 1.1.7 Epidemiologia..... | 26 |
| 1.1.8 Ações para Controle da TB | 27 |
| 1.1.9 Tratamento da TB | 29 |
| 1.2 RESISTÊNCIA NA TUBERCULOSE..... | 32 |
| 1.2.1 Inquéritos Mundiais de Resistência..... | 34 |
| 1.2.2 Fatores Associados com o Desenvolvimento da Resistência | 38 |
| 1.2.3 Mecanismos de Resistência de <i>M. tuberculosis</i> aos Fármacos | 39 |
| 1.2.4 Mecanismo de Ação e Resistência dos Fármacos Anti-TB..... | 41 |
| 1.3 ISONIAZIDA: MECANISMO DE AÇÃO E RESISTÊNCIA EM <i>M. tuberculosis</i> ... | 44 |
| 1.3.1 Aspectos Gerais | 44 |
| 1.3.2 Mecanismo de Ação da INH em <i>M. tuberculosis</i> | 45 |
| 1.3.3 Bases Moleculares da Resistência de <i>M. tuberculosis</i> à INH..... | 46 |
| 1.3.4 Gene <i>katG</i> e a Resistência à INH | 47 |
| 1.4 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ANTI-TB..... | 51 |

| | |
|-------------------------------------|-----|
| 1.4.1 Métodos Fenotípicos | 52 |
| 1.4.2 Métodos Genotípicos | 54 |
| 2. OBJETIVOS | 59 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 59 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 59 |
| 3. MANUSCRITO | 61 |
| 4. DISCUSSÃO | 82 |
| 5. PERSPECTIVAS..... | 87 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 88 |
| 7. APÊNDICES..... | 115 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------|---|
| AIDS | <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> |
| ATA | <i>American Thoracic Association</i> |
| BAAR | Bacilo Álcool-Ácido Resistente |
| BCG | Bacilo de <i>Calmette Guérin</i> |
| BK | Bacilo de Koch |
| CDC | <i>Centers for Disease Control</i> |
| CDCT | Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| CFZ | Clofazimina |
| CMI | Concentração Mínima Inibitória |
| CONRAS | <i>Colorimetric Nitrate Reductase-based Antibiotic Susceptibility</i> |
| CPM | Ciprofloxacina |
| DNA | Ácido Desoxiribonucléico |
| dNTPs | Desoxinucleosídeos Trifosfatos |
| DOTS | <i>Directly Observed Treatment Strategy</i> |
| EHR | Ensaio de Hibridização Reversa |
| EMB | Etambutol |
| ETH | Etionamida |
| FAS I | <i>Fatty Acid Synthetase I</i> |
| FEPPS | Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde |
| HIV | <i>Human Immunodeficiency Virus</i> |
| INH | Isoniazida |
| IS | <i>Insertion Sequence</i> |
| IUATLD | <i>International Union Against Tuberculosis and Lung Disease</i> |
| <i>k</i> | <i>Kappa</i> |
| LJ | <i>Löwenstein-Jensen</i> |

| | |
|----------|--|
| MDR | Multidroga Resistente |
| MGIT | <i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i> |
| MODS | <i>Microscopic Observation Broth Drug Susceptibility Assay</i> |
| MS | Ministério da Saúde |
| NRA | <i>Nitrate Reductase Assay</i> |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PAS | Ácido p-Aminosalicílico |
| pb | Pares de Bases |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| PCR-SSCP | <i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i> |
| PCR-RFLP | <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> |
| PNCT | Plano Nacional de Controle da Tuberculose |
| PPD | <i>Purified Protein Derivative</i> |
| PZA | Pirazinamida |
| RHA | <i>Reverse Hybridization Assay</i> |
| RMP | Rifampicina |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| RNTA | <i>Royal Netherlands Tuberculosis Association</i> |
| SM | Estreptomicina |
| TB | Tuberculose |
| TB-MDR | Tuberculose Multidroga Resistente |
| TBMR | Tuberculose Multirresistente |
| TB-XDR | Tuberculose Extensivamente Multidroga Resistente |
| TSA | Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos |

| | |
|-----|----------------------------------|
| TZ | Tiacetazona |
| VT | Virgem de Tratamento |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Países com casos confirmados de TB-XDR no mundo | 34 |
| Figura 2. Fórmula estrutural da isoniazida | 44 |
| Figura 3. Mutações encontradas no gene <i>KatG</i> em isolados resistentes à isoniazida em <i>M. tuberculosis</i> | 50 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquemas de tratamento da TB utilizados no Brasil desde 1979..... 31

Tabela 2. Inquérito de Prevalência de Resistência no Brasil entre 1995 e 1997 36

RESUMO

A caracterização das mutações nos genes *katG*, *ahpC* e *inhA* e sua correlação com a resistência à isoniazida em isolados de *Mycobacterium tuberculosis* tem sido descrita. A mutação S315T no gene *katG* é a mais freqüentemente encontrada e pode fornecer rápida informação para a seleção do tratamento anti-tuberculose, para a vigilância epidemiológica da resistência e, possivelmente rastrear a transmissão de linhagens resistentes.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de um Ensaio de Hibridização Reversa (EHR) para a rápida identificação da mutação no códon 315 do gene *katG* em *M. tuberculosis*. Após a padronização da metodologia com 180 DNAs de *M. tuberculosis* isolados de cultura, o teste foi aplicado a 46 DNAs isolados de amostras clínicas e foram testados para a detecção de mutantes *katG315* resistentes à isoniazida.

Quando aplicado em DNA de cultura o teste pôde detectar com sucesso a mutação mais comum no *katG315* (AGC → ACC) em todas as linhagens estudadas em comparação com o seqüenciamento de DNA. Em relação às amostras clínicas, o EHR apresentou concordância com o seqüenciamento em todas as amostras com baciloscopia positiva.

O teste desenvolvido apresenta um bom potencial para a rápida identificação da resistência à isoniazida em regiões com uma elevada prevalência de mutantes *katG315* entre isolados de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida.

ABSTRACT

Mutations in *katG*, *ahpC* and *inhA* genes were identified and have been correlated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates, mutation in *katG* S315T being the most frequent. Rapid detection of this mutation could therefore improve the choice of an adequate anti-TB regimen, epidemiological monitoring of isoniazid resistance and, possibly to track transmission of resistant strains.

Reverse Hybridization Assay (RHA) is a simple technique for the rapid identification of *katG*315 mutation in *M. tuberculosis*. The assay was standardized with 180 DNAs isolated from cultures of *M. tuberculosis* and was applied to 46 clinical specimens and tested for the detection of isoniazid-resistant *katG*315 mutants.

When the test was applied to the DNA from cultured *M. tuberculosis* it was possible to successfully detect the most common mutation at *katG*315 (AGC→ACC) in all isolates studied in comparison with DNA sequencing. For clinical samples, the RHA presented agreement with the sequencing in all samples with smear positive.

The developed test presents a good potential for the rapid identification of isoniazid resistance in regions with a high prevalence of *katG*315 mutants among isoniazid-resistant *M. tuberculosis* isolates.

1. INTRODUÇÃO

1.1 TUBERCULOSE – MAGNITUDE DA DOENÇA

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) uma pessoa por segundo é infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, o bacilo causador da tuberculose (TB). A TB representa um sério problema de saúde pública envolvendo aspectos sociais e econômicos para o Brasil e o mundo. Atualmente, um terço da população mundial está latentemente infectada pelo bacilo da TB e 10% destas pessoas irão desenvolver a doença ativa em algum momento da sua vida. Em 2006, foram notificados 9,2 milhões de novos casos de TB e 1,7 milhões de mortes foram atribuídas à doença (WHO, 2008).

Entre as razões para tal cenário, deve-se assinalar a desigualdade social, o advento da AIDS, os movimentos migratórios, a falta de novos produtos para diagnóstico, prevenção e tratamento, o abandono do tratamento e a má qualidade dos serviços de saúde (WHO, 2008). Além disso, a tuberculose multidroga resistente (TB-MDR) e mais recentemente a TB extensivamente multidroga resistente (TB-XDR) complicam o controle da doença em nível mundial (DORMAN & CHAISSON, 2007; RAVIGLIONE & SMITH, 2007; SHAH *et al.*, 2007; WHO, 2008). O surgimento de linhagens resistentes é preocupante, pois existem poucos fármacos efetivos contra a TB, o que tornaria a doença sem tratamento e cura. Em virtude disso, a OMS estimula novas medidas de controle, tais como novos métodos diagnósticos, melhores fármacos anti-TB e uma vacina mais eficaz. Por este motivo, a detecção rápida de resistência aos fármacos utilizados no tratamento da doença tornou-se um elemento fundamental para os programas de controle da TB (WHO, 2008).

1.1.1 Um Breve Histórico

A TB provavelmente tenha surgido em 5.000 a.C. suspeita evidenciada por deformidades ósseas encontradas em esqueletos de múmias do Egito (DANIEL, 2006).

Existem várias teorias que explicam o surgimento de *M. tuberculosis*. Uma delas seria que este microorganismo teria surgido a partir da evolução do *Mycobacterium bovis*.

Com a evolução dos mamíferos, o mutante *M. bovis*, desenvolveu a capacidade de parasitar um amplo espectro de animais de sangue quente como os bovinos (STEELE & RANNEY, 1958). Os primeiros contatos da micobactéria com a raça humana provavelmente foram esporádicos e causados pelo ato de comer carne crua ou inadequadamente cozida. A convivência do homem com o gado foi proposta como o fator que gerou a evolução de *M. tuberculosis*. Durante os invernos, as pessoas dividiam suas casas com seus animais para a conservação do calor. Isso criou um nicho para o desenvolvimento de um mutante mais patogênico para humanos e menos agressivo para a maior parte dos animais. Da mesma forma que *M. bovis*, *M. tuberculosis* não podia sobreviver no meio ambiente, e sua sobrevivência dependia da transmissão de hospedeiro para hospedeiro. Entretanto, isolamentos geográficos, tanto por desertos, como por oceanos ou montanhas, mantiveram as populações razoavelmente isentas das pressões seletivas de *M. tuberculosis* por séculos. Estudos genéticos das micobactérias revelaram enormes semelhanças entre os DNAs de *M. bovis* e de *M. tuberculosis*, indicando que essa teoria evolutiva possa ser real (STEAD *et al.*, 1990). O fator essencial para a disseminação epidêmica foi o início da Revolução Industrial no século XVIII, quando as cidades se tornaram populosas e as condições de pobreza reinantes facilitaram o início da epidemia (STEAD & BATES, 1995). A epidemia cresceu e espalhou-se pela Europa, foi levada para a América do Norte pelos pecuaristas europeus e foi crescendo na medida em que os nativos eram forçados a viver aglomerados em reservas. Os jesuítas também foram responsáveis pela introdução da TB nas Américas, principalmente na do

Sul. À medida que os europeus colonizavam outras regiões, portadores de TB pulmonar crônica levavam a doença para outros portos (BATES & STEAD, 1993).

Em 1882, o microbiologista alemão Robert Koch identificou o agente etiológico da tuberculose, *M. tuberculosis* ou Bacilo de Koch (BK) (KAUFMANN, 2003). Essa descoberta concedeu a ele o Prêmio Nobel em Medicina em 1905 (BLOOM & MURRAY, 1992). Ainda em 1882, Paul Ehrlich descobriu que o bacilo da TB tinha a propriedade de resistir à descoloração por uma solução de álcool-ácido. Ehrlich propôs então um método de coloração que mais tarde foi melhorado por Franz Ziehl e modificado novamente por Friedrich Neelsen, resultando no método de coloração conhecido por Ziehl-Neelsen (BECK, 2000). Atualmente, essa técnica ainda é utilizada para o diagnóstico da TB (BRASIL, 2001).

O ano de 1906 foi marcado pelo desenvolvimento de uma vacina com linhagens de *M. bovis* com virulência atenuada por Albert Calmette e Camille Guérin (DANIEL, 2006). Esta vacina chamada de BCG (bacilo de Calmette-Guérin) ainda é amplamente aplicada nos dias de hoje. No Brasil, a vacina BCG oral foi aplicada pela primeira vez em recém-nascidos no ano de 1927. A partir da década de 40 começou a utilização dos fármacos anti-TB: estreptomicina (SM), a partir de 1948; ácido paramino-salicílico (PAS), a partir de 1949 e isoniazida (INH), a partir de 1952. A utilização de esquemas terapêuticos padronizados começou efetivamente a partir da década de 60 inicialmente com duração de 18 meses (RUFFINO-NETTO, 2002).

As taxas de morbidade e mortalidade devido a TB reduziram gradativamente durante o século XX no mundo desenvolvido, auxiliado por melhores práticas de saúde pública, melhorias nas condições socioeconômicas e programas de imunização com a vacina BCG, bem como pelo desenvolvimento dos antimicrobianos na década de 1950. Estas novas tecnologias determinaram uma sensível redução do número de casos de TB nos países economicamente desenvolvidos. Entretanto, no final do século XX, houve um aumento no número de casos da doença, mesmo nas regiões economicamente desenvolvidas, sendo a TB considerada uma doença de emergência global em 1993 pela OMS (TAYLOR *et al.*, 2003). No ano de 1994, a OMS propôs o DOTS (Directly

Observed Treatment Strategy) como estratégia para o controle da doença. As maiores causas para este aumento foram o crescimento da pobreza nas grandes áreas metropolitanas, o aumento da imigração e a epidemia da AIDS.

1.1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis é o principal agente infeccioso da TB. É um dos componentes do complexo *M. tuberculosis*, juntamente com outros membros: *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* (CATALDI & ROMANO, 2007).

As micobactérias pertencem à ordem dos *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*. As bactérias que compõe este gênero, apesar de serem diferentes em relação à morfologia das colônias e às propriedades bioquímicas, possuem características taxonômicas comuns, como presença de ácidos micólicos de alto peso molecular (60 a 90 carbonos) em sua parede celular, ácido desoxirribonucléico (DNA) com 61% a 71% de teor de guanina e citosina (G+C), e são consideradas bacilo álcool-ácido resistentes (BAAR) quando expostas a coloração tintorial pelo método de Ziehl-Neelsen (GOODFELLOW & MAGEE, 1998). Os lipídios e os ácidos micólicos presentes na parede celular tornam as micobactérias difíceis de serem coradas pelo método de Gram (BLACK, 2002).

O bacilo da TB é classificado como aeróbico estrito, parasita intracelular facultativo, não formador de esporos, sem flagelos (imóvel) e não produtor de toxinas. O envelope celular é complexo (alto conteúdo lipídico) e serve de proteção à ação de agentes químicos, embora seja facilmente destruído por agentes físicos, como calor, luz solar e radiação ultravioleta. Fora do parasitismo, o bacilo só consegue sobreviver no meio externo por algumas horas (BRENNAN & NAKAIDO, 1995; METCHOCK *et. al*, 1999). Os membros do complexo *M. tuberculosis* são bactérias de multiplicação lenta com um tempo de geração perto de 24 horas e levam de 3 a 8 semanas para formar colônias em meios de cultura dependendo da oferta de oxigênio, nutrientes e pH do meio (KENT & KUBICA, 1985). Este é um tempo relativamente longo comparado a outras bactérias

cultiváveis que, normalmente, tem suas divisões contadas em minutos (CHAUHAN, 2006). A taxa de crescimento lenta pode ser parcialmente determinada pela impermeabilidade da parede celular que limita a captação de nutrientes (HARSHEY,1977). Este crescimento lento do bacilo condiciona a evolução crônica da doença (KRITSKI *et al.*, 2000).

O genoma completo da linhagem H37Rv de *M. tuberculosis* foi completamente seqüenciado em 1998. Sua análise mostrou que o DNA deste organismo é composto de 4.411.529 pb, contém em torno de 4.000 genes e um conteúdo de G + C de 65,5% (COLE, 1998). Uma reavaliação completa deste genoma foi apresentada quatro anos após e foram incluídos 82 novos genes e o tamanho da seqüência passou para 4.411.532 pb (CAMUS *et al.*, 2002).

Uma característica amplamente estudada do complexo *M. tuberculosis* é a presença e distribuição de seqüências ricas em DNA repetitivo, chamadas seqüências de inserção (IS). O elemento IS6110, membro da família IS3, não é somente o mais abundante como também o melhor caracterizado, sendo que o número de cópias varia de linhagem para linhagem. O conteúdo de G + C é constante em todo o seu genoma, indicando provável ausência de transferência horizontal de genes envolvidos com a patogenicidade (COLE *et al.*, 1998).

Outra característica importante no genoma de *M. tuberculosis* é a presença de genes de síntese e degradação de quase todos os tipos de lipídios, de ácidos graxos simples a moléculas complexas, como os ácidos micólicos. Esta característica de *M. tuberculosis* pode estar relacionada com a sua habilidade de crescimento nos tecidos do hospedeiro (SMITH, 2003).

M. tuberculosis tem a capacidade de entrar em períodos de latência com uma atividade metabólica limitada, dificultando a ação dos antimicrobianos, contribuindo para a natureza crônica da doença e impondo um regime de tratamento longo. Além disso, existem, numa mesma infecção, populações de bacilos de comportamentos diferentes em função de sua localização e atividade. Assim, os bacilos presentes nas cavidades pulmonares multiplicam-se de forma ativa em um ambiente aeróbio, os bacilos do interior dos macrófagos, o fazem em um ambiente microaerofílico, que induz a latência, e os bacilos que se encontram no interior da lesão caseosa têm, ocasionalmente, um ciclo replicativo. Por outro

lado, *M. tuberculosis* pode multiplicar-se nos tecidos, onde a penetração dos antimicrobianos é fácil, porém no material caseoso a penetração dos antimicrobianos é mais difícil. Os fármacos anti-TB apresentam um perfil de atividade diferenciado frente a cada uma dessas localizações e populações, e é necessário assegurar-se de que o tratamento prescrito seja ativo contra todas elas (COLL, 2003).

O estado de dormência, no qual o bacilo permanece quiescente sem infectar os tecidos, pode ser resultado da ação de mediadores celulares da resposta imune que podem conter, mas não erradicar a infecção. Quando a imunidade diminui, as bactérias dormentes reativam-se, causando a deflagração da doença, mesmo décadas após a infecção inicial (COLE, 1998). Tal propriedade tem um importante significado clínico, já que a TB freqüentemente representa a reativação de uma infecção antiga ocorrida há vários anos (CHAN & KAUFMANN, 1994).

1.1.3 Características Gerais da Doença

Em aproximadamente 85% dos casos de TB o sítio envolvido é o pulmão e nos demais 15%, a doença pode estar localizada em outro órgão (TB extrapulmonar) ou envolvendo ambos os sítios pulmonar e não pulmonar (HOPEWEL, 1994). Essa distribuição é alterada em pacientes com AIDS, sendo relativamente maior o número de casos de TB extrapulmonar (BLOOM, 1994).

As manifestações clínicas da TB variam muito e dependem de diversos fatores, inerentes ao microrganismo e ao hospedeiro (imunodeficiência, desnutrição, etc), bem como as suas interações, as quais influenciam diretamente na apresentação clínica da doença (ATS, 2000).

Como a TB é normalmente adquirida por inalação do bacilo, a localização inicial é no pulmão. Os sintomas gerais da TB pulmonar são febre, sudorese, perda ponderal, anorexia e adinamia. Todos estes sinais e sintomas são inespecíficos e podem estar presentes em outras enfermidades pulmonares. Inicialmente, nos pacientes não imunodeprimidos, o sintoma respiratório

usualmente referido é tosse acompanhado de expectoração mucopurulenta, às vezes com sangue e dor torácica (KRITSKI *et al.*, 2000).

Nos casos de TB extrapulmonar, entre os pacientes não imunodeprimidos, os sinais e sintomas dependerão do órgão afetado. As localizações mais freqüentes são: pleura, linfonodos, sistema nervoso central, rins e ossos. No caso de TB miliar, que é a forma mais grave da doença, ocorre uma disseminação hematogênica de um grande número de bacilos resultando em lesões granulomatosas por todo o organismo, podendo ser fatal se não tratada adequadamente (BLOOM, 1994). A TB extrapulmonar normalmente apresenta maiores problemas no diagnóstico que a TB pulmonar, pois envolve sítios, relativamente inacessíveis e, pela natureza destes, pequenas quantidades de bacilos presentes podem causar sérios danos ao indivíduo infectado. O pequeno número de bacilos presentes na amostra clínica acarreta uma maior dificuldade da identificação bacteriológica sendo que os procedimentos invasivos são, freqüentemente, requeridos para estabelecer o diagnóstico (KRITSKI *et al.*, 2000).

1.1.4 Transmissão

A TB é normalmente transmitida por inalação do bacilo, que se aloja no pulmão, podendo disseminar-se para outros órgãos. Os doentes com a forma pulmonar bacilífera, especialmente as cavitárias, constituem a principal fonte de disseminação da doença, pois eliminam gotículas ou partículas (núcleo de Wells) de até 10 µm de diâmetro, contendo de 2 a 10 bacilos, através da fala, tosse e espirro. Um paciente pulmonar bacilífero, se não tratado, em um ano pode infectar de 10 a 15 pessoas. As gotículas são estáveis e, quando eliminadas, ficam em suspensão no ar por várias horas, podendo chegar aos alvéolos pulmonares onde se multiplicam. As gotículas maiores com quantidades maiores de bacilos não constituem fonte de infecção, porque logo se depositam no solo não formando aerossóis. Os bacilos depositados na pele intacta não conseguem invadir o tecido (BATES, 1980; STEAD & DUTT, 1989).

A descoberta precoce dos doentes bacilíferos entre os sintomáticos respiratórios e outros grupos de risco e a introdução de um tratamento

antimicrobiano eficaz, além de curar o doente, reduzem a capacidade de transmissão e assim proporciona a quebra da cadeia epidemiológica da doença (ATS, 2000; TRUJILLO & KRITSKI, 2000).

Uma vez infectado, o indivíduo pode permanecer alguns anos, ou até mesmo toda a sua vida sem desenvolver a doença. A evolução para a doença depende de múltiplos fatores relacionados com o microrganismo (virulência) e com o hospedeiro (imunidade, fatores genéticos e existência de outras doenças) (BLOOM, 1994).

1.1.5 Imunologia e Associação TB/HIV

A TB pulmonar se desenvolve após a inalação de pequenas partículas ou gotículas que são carregadas até a árvore brônquica e se instalam nos alvéolos pulmonares sofrendo a ação dos neutrófilos e macrófagos alveolares. Uma parte dos bacilos consegue escapar da ação dos macrófagos e se multiplicar. A multiplicação bacilar provoca destruição de macrófagos, liberação de enzimas dos lisossomos e conseqüente destruição tecidual, com reação inflamatória inespecífica e a formação de granuloma, que é a lesão inicial da doença ou primoinfecção. Os linfócitos T-CD4 são responsáveis pela formação do granuloma, morte dos bacilos e contenção da lesão, produção de lisozima, necrose tecidual e disseminação da lesão. Antes do aparecimento da imunidade celular, os bacilos se disseminam através do sistema linfático, aos linfonodos (complexo primário) e então, atingindo a corrente sanguínea chegam a sítios mais distantes. Em 95% dos casos a primoinfecção é detida com a imunidade celular, o bacilo permanece com inatividade metabólica, chamada de TB quiescente ou latente (HOPEWELL, 1994; CHAN & KAUFMANN, 1994; DANNEMBERG & ROOK, 1994; KRITSKI *et al.*, 1998; ATS, 2000).

Caso o processo não seja impedido ocorrerá a TB primária, resultante da evolução do complexo pulmonar primário, que ocorre em 5-10% dos infectados. Havendo a quebra do equilíbrio entre o indivíduo e o bacilo durante o período de latência, ocorrerá a TB pós-primária devido a diminuição da resposta imune local ou sistêmica, ocorrendo a reativação endógena. Poderá também ocorrer nova

inalação de grande quantidade de bacilos, associada ou não à imunodeficiência, instalando-se a reinfecção exógena (SMITH & MOSS 1994; KRITSKI *et al.*, 2000).

A infecção pelo HIV é um potente fator de risco para a TB. Além do aumento do risco, tem colaborado para a reativação da infecção latente por *M. tuberculosis*, aumentando com isso, logo após a infecção ou reinfecção, a progressão acelerada da TB (MARIANI, 2001). Nas pessoas infectadas somente com *M. tuberculosis*, o risco de desenvolver TB durante a vida é de 10%. Entretanto, em pessoas co-infectadas com TB e HIV, o risco anual pode exceder 10% (CORBETT *et al.*, 2003; AARON, 2004). O sistema imune dos pacientes com AIDS não consegue limitar a multiplicação de *M. tuberculosis* que ocorre nos estágios iniciais da infecção. A habilidade do HIV em infectar e debilitar os linfócitos T proporciona a suscetibilidade às infecções oportunistas. Dessa forma, os macrófagos tornam-se impotentes em suas funções, devido ao contínuo declínio de linfócitos T e à insuficiência de fatores ativadores de macrófagos, tal como o interferon gama. Considerando que muitos deles possam estar co-infectados com bacilos da TB, em dormência, este é um momento em que a infecção pode ser reativada (WAHL *et al.*, 1999).

1.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da TB é realizado por exame clínico, baseado nos sintomas relatados e no exame físico que possibilitam o diagnóstico preliminar da doença a ser confirmada por outros exames; exame radiológico de tórax, pode revelar imagens no pulmão sugestivas de TB, mas sua simples realização não é suficiente para confirmar a doença; prova ou reação tuberculínica, também conhecida como PPD (*Purified Protein Derivative* – derivado purificado de fração protéica antigênica do bacilo) ou reação de Mantoux, é uma reação intradérmica que apenas verifica se o indivíduo teve ou não contato com o bacilo; diagnóstico laboratorial, é o que confirma o diagnóstico de TB (BRASIL, 2001).

O diagnóstico laboratorial da TB ainda se baseia nos métodos bacteriológicos clássicos da baciloscopia ou exame microscópico, e da cultura em meio seletivo para micobactérias.

A baciloscopia direta do escarro é o método básico para o diagnóstico da TB na forma pulmonar. Consiste na pesquisa de BAAR em esfregaços da amostra, preparados e corados com metodologia padronizada. O método de Ziehl-Neelsen é o mais utilizado e está baseado na capacidade das micobactérias em reter a fucsina após coloração onde se apresentam como bastonetes, ligeiramente delgados, corados em vermelho com fundo azul, que não descora com álcool-ácido, sendo por isso referidas como BAAR (BLOOM, 1994; BRASIL, 2001). A baciloscopia é simples, rápida, de fácil execução e de baixo custo. No entanto esta técnica é pouco sensível, detectando apenas 60% dos materiais clínicos com crescimento em cultura, e não é específica, uma vez que não é possível distinguir entre as espécies de micobactérias descritas, necessitando tipagem da micobactéria posteriormente (STYBLO & ROUILLON, 1981). A sensibilidade do método depende da presença de mais de 5000 organismos por mL de amostra para um resultado positivo e isto significa que um esfregaço negativo não exclui um caso de TB. Esse fato é ainda mais notável quando a infecção ocorre em outros órgãos (pleura, meninges), onde um número ainda menor de organismos pode causar manifestações clínicas (ROUILLON *et al.*, 1976).

O isolamento de micobactérias em meio de cultura é um método bacteriológico mais sensível e específico que a baciloscopia para o diagnóstico da TB, sendo por isso considerado padrão-ouro. A cultura pode detectar a partir de 10 a 100 bacilos viáveis por mL de amostra, permitindo também identificar o microrganismo em nível de espécie. A cultura é indicada para os suspeitos de TB pulmonar persistentemente negativos ao exame direto, para o diagnóstico de formas extrapulmonares e para os casos de suspeita de resistência bacteriana aos fármacos, quando deve ser realizado o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) (BRASIL, 2002b). Tradicionalmente, o isolamento através da cultura tem sido realizado em meios sólidos e/ou líquidos, tais como o meio: Löwenstein-Jensen (LJ), que é o mais utilizado, e aqueles que utilizam o ágar, como o meio Middlebrook (7H-10 e 7H-11). O crescimento só é detectável 3 a 8 semanas após a inoculação (KUBICA & KENT, 1985). Como qualquer espécie de micobactéria pode se desenvolver nesses meios é preciso realizar testes de

identificação, que possibilitam a diferenciação de *M. tuberculosis* de outras micobactérias, em amostras de culturas positivas para BAAR (BRASIL, 2001). Quando os espécimes utilizados para o cultivo são escarro, urina e secreção de cavidade aberta, normalmente contaminados, é necessário eliminar a flora associada, que contamina o meio e impede a multiplicação dos bacilos. O método de descontaminação mais utilizado é o tratamento com hidróxido de sódio e/ou N-acetil-L-cisteína/NaOH (KUBICA & KENT, 1985). A sensibilidade e especificidade da cultura variam consideravelmente conforme o material a ser analisado, de 30% a 96% e de 98% a 100% respectivamente (BLOOM, 1994, ATS, 2000).

A partir da década de noventa, técnicas de biologia molecular como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) passaram a ser utilizadas para o diagnóstico de diversas doenças, inclusive a TB. A vantagem destes testes é a alta sensibilidade e especificidade, além de oferecer o resultado em um curto espaço de tempo. A PCR permite a detecção de quantidades mínimas de material genético dependendo dos métodos utilizados para a extração da amostra e detecção do produto amplificado (ROSSETTI *et al.*, 1997).

1.1.7 Epidemiologia

Segundo a OMS, aproximadamente 1/3 da população mundial (2 bilhões) está infectada por *M. tuberculosis*. Em 2006, surgiram 9.2 milhões de casos novos de TB no mundo (139 por 100 000 habitantes), sendo destes 8% co-infectados com HIV, com uma prevalência de mais de 14 milhões e aproximadamente 1.7 milhões de mortes. Também em 2006, foram estimados 0.5 milhões de casos de TB-MDR. Os países com maior número de casos de TB são respectivamente Índia, China, Indonésia, África do Sul e Nigéria (WHO, 2008).

A identificação dos 22 países responsáveis por aproximadamente 80% da TB mundial em 2000 fez com que novas estratégias para o controle da doença fossem delineadas, além disso, houve o comprometimento dos governantes destes países em considerar a TB como um alvo a ser combatido. O Brasil ocupa o 16º lugar entre os 22 países que são responsáveis por 80% de todos os casos estimados de TB no mundo (WHO, 2008).

No Brasil, em 2006, foram notificados aproximadamente 94.000 casos novos de TB, correspondendo a um coeficiente de incidência de 50/100.000 habitantes e uma taxa de mortalidade de 4.0/100.000 habitantes (WHO, 2008). No Rio Grande do Sul, em 2006, foram notificados 5.176 novos casos de TB, com incidência de 47/100.000 habitantes. Em Porto Alegre, a incidência de TB foi em torno de 112/100.000 habitantes, o que representa aproximadamente 1.300 novos casos por ano, sendo em torno de 26% destes pacientes co-infectados com o vírus HIV (SES - RS, 2007).

Apesar dos esforços empreendidos mundialmente, a TB constitui-se, ainda, uma importante ameaça para a saúde pública. Os avanços no seu conhecimento e na tecnologia disponível para controlá-la não tem sido suficientes para impactarem significativamente em sua morbi-mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento.

1.1.8 Ações para Controle da TB

A partir da declaração de "estado de emergência global para a TB" pela OMS, foram elaboradas ações para o controle da doença. Em 1994, foi lançada a estratégia DOTS que compreende cinco elementos considerados essenciais para o controle global da TB: (i) comprometimento governamental para sustentar as atividades do controle da TB; (ii) detecção de casos, por meio da baciloscopia de escarro, entre os sintomáticos respiratórios; (iii) regime de tratamento de 6 a 8 meses para todos os casos confirmados de baciloscopia positiva, com tratamento diretamente observado para, no mínimo, os 2 meses iniciais; (iv) suprimento regular e ininterrupto dos fármacos anti-TB; e (v) sistema padronizado de coleta e relatórios de dados para permitir a avaliação do tratamento de cada paciente e do programa de controle da TB como um todo. Observa-se que alguns desafios dificultam ainda a implementação do DOTS, como o impacto do HIV, o colapso do sistema de saúde e o surgimento da TB-MDR (WHO, 1999). A estratégia DOTS, se implementada corretamente, é uma das intervenções com melhor custo-benefício disponível para a saúde pública (WORLD BANK, 1993). Além disso,

pode prevenir para que a TB-MDR torne-se um sério problema na população (WHO, 2004).

Em 1999, a OMS criou a estratégia DOTS-Plus que avalia e gerencia a TB-MDR. Essa estratégia inclui além de todos os componentes do DOTS, outros aspectos como a duração do tratamento de 18 a 24 meses, o uso de fármacos de segunda linha, disponibilidade de realização de testes de susceptibilidade, unidade de atendimento e tratamento especializado (ESPINAL *et al*, 1999; WHO, 2000a). A estratégia DOTS-Plus deveria ser implementada em áreas com níveis moderados a altos de TB-MDR para combater uma epidemia emergente (WHO 2002; SHARMA, 2006).

A mais nova estratégia chamada “Plano Global de Combate à Tuberculose - Stop TB” (2006-2015) reúne diversas instituições de alto nível científico e/ou poder econômico, tais como: a OMS, o Centers for Disease Control (CDC) - Atlanta, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), Royal Netherlands Tuberculosis Association (RNTA) e American Thoracic Association (ATA) (RUFFINO-NETTO, 2002). O Stop-TB tem como meta: reduzir drasticamente a incidência da TB até 2015, reduzir em 50% a prevalência e as mortes decorrentes por TB em relação a 1990 e até 2050 eliminar a TB como problema de saúde pública (1 caso por milhão de habitantes) (WHO, 2006). Entre as medidas adotadas para estes objetivos destacam-se a expansão do DOTS, desenvolvimento de fármacos mais eficazes, uma vacina mais efetiva, novos diagnósticos e uma detecção rápida da resistência.

No Brasil, em 1998, o Ministério da Saúde lançou o Plano Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) que prevê o diagnóstico feito fundamentalmente através da baciloscopia em todos os sintomáticos respiratórios e contatos, disponibilidade de fármacos anti-TB, tratamento supervisionado e vigilância da resistência aos fármacos. Este plano baseia suas ações através da articulação das três esferas de gestão do Sistema Único de Saúde (União, Estados e Municípios) (RUFFINO-NETTO, 2002).

Apesar dos esforços feitos pelos órgãos de saúde, ainda existem problemas inerentes à doença que incluem o surgimento de linhagens resistentes aos fármacos utilizados no tratamento, à alta correlação da incidência da doença

em populações pobres, a imunodepressão causada pelo HIV, criando assim condições ideais para a transformação da TB em uma doença oportunista (BRASIL, 2002a).

1.1.9 Tratamento da TB

O controle das enfermidades infecciosas em geral está relacionado à melhoria das condições sócio-econômicas da população, melhoria dos sistemas de saúde, programas de vacinação e implantação de um tratamento eficaz (PETRINI & HOFFNER, 1999). A vacina disponível atualmente, a BCG, é indicada principalmente para prevenir as formas severas da TB (miliar e meníngea) em crianças e não apresenta eficácia para reduzir o número de casos de infecções pulmonares em adultos (STYLBO & MEIJER, 1976). Como a vacina apresenta baixa eficácia para evitar a enfermidade, o correto tratamento assume o duplo papel de curar o enfermo e evitar a transmissão do bacilo (PETRINI & HOFFNER, 1999).

A quimioterapia é fundamental no controle da TB, pois interrompe a cadeia de transmissão, que são os pacientes bacilíferos. No entanto é necessário que os fármacos sejam utilizados em esquemas terapêuticos padronizados: (i) administrados em combinação de pelo menos três fármacos, com ação sobre diferentes sítios de lesão e sobre diferentes fases do metabolismo bacteriano, para prevenir o desenvolvimento de resistência; (ii) prescritos corretamente e por tempo prolongado de tratamento, visando atingir os bacilos de crescimento lento e intermitente; e (iii) tomados regularmente para manter as concentrações necessárias sobre a população bacilar (BRASIL, 1995; IUATLD, 2000).

Os fármacos eficazes contra micobactérias podem ser divididos em duas categorias: (i) fármacos de amplo espectro que tem atividade contra micobactérias e muitas outras espécies bacterianas: cicloserina, fluoroquinolonas, macrolídeos, rifamicinas, estreptomicinas; (ii) fármacos que têm espectro específico, com atividade restrita a micobactérias, ou mesmo a apenas espécies micobacterianas: etionamida (ETH), INH, PAS, ciprofloxacina (CPM), etambutol

(EMB), pirazinamida (PZA), tiacetazona (TZ), e clofazimina (CFZ) (CHOPRA & BRENNAN, 1998).

Uma quimioterapia efetiva para TB é constituída de uma fase de ataque e uma de manutenção. A fase de ataque inclui fármacos com propriedade bactericida contra o rápido crescimento do microorganismo, como INH, RMP, SM e EMB. A esterilização da população bacilar semidormente em ambiente intracelular ácido, cujo pH é 5,5 (dentro dos lisossomos dos macrófagos) é conseguida pela ação de PZA. A RMP é mais ativa contra organismos semidormentes em meio não ácido. Após a redução da população bacteriana passa-se então à fase de manutenção, com o intuito de destruir os bacilos que se encontram extracelularmente no material caseoso, e eliminar algum bacilo dormente prevenindo assim a recorrência da infecção (FUCHS & WANNMACHER, 1992).

Assim o tratamento da TB deve ser feito sempre com associação de fármacos, evitando o desenvolvimento de linhagens resistentes, considerando que, numa população bacilar que infecta o paciente, há sempre uma proporção desta população que é naturalmente resistente aos fármacos, por mutações espontâneas (MITCHISON, 1985; BLANCHARD, 1996; ZHANG & TELENTI, 2000; GILLESPIE, 2002).

No Brasil, o tratamento para TB é feito, obrigatoriamente, na rede pública de saúde e os fármacos são fornecidos gratuitamente nas unidades de saúde. Em 1979 a Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária/Ministério da Saúde normatizou para todo o país um Programa de Controle da Tuberculose tendo como base fundamental o tratamento quimioterápico, com um esquema de primeira linha, chamado Esquema 1 (E-1) ou RHZ de curta duração: RMP, INH e PZA por 2 meses, seguidos de RMP e INH por 4 meses. O E-1 é indicado para todas as formas de tuberculose sem uso prévio de medicação e, para o retratamento, nos casos de recidiva depois de curados, desde que estes pacientes tenham tido alta por cura há mais de cinco anos. Para pacientes que se tornaram positivos após abandonar o tratamento inicial com E-1 ou apresentaram recidiva após cura (período menor que 5 anos) com o E-1, utiliza-se esquema 1 reforçado (E-1R) com EMB. Para TB extrapulmonar, na forma meningoencefálica,

é recomendada uma terapia mais prolongada, esquema 2 (E-2), o qual é constituído pelo uso de RMP, INH e PZA por dois meses, seguidos de RMP e INH por sete meses (BRASIL, 2002a). Os esquemas de tratamento adotados no Brasil desde 1979 estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Esquemas de tratamento da TB utilizados no Brasil desde 1979.

| Esquemas de Tratamento da TB | | |
|---|--------------------------------------|--|
| Sem tratamento anterior casos novos de todas as formas exceto meningite tuberculosa | Esquema I | 2 meses: RMP / INH / PZA 4 meses: RMP / INH |
| Com tratamento anterior casos de retratamento em recidivas ou retorno após abandono do E-1 | Esquema I Reforçado | 2 meses: RMP / INH / PZA 4 meses: RMP / INH / EMB |
| Meningite tuberculosa | Esquema II | 2 meses: RMP / INH / PZA 7 meses: RMP / INH |
| Falência do E-1, E-1 R ou E-2 | Esquema III | 3 meses: SM / ETH / PZA 9 meses: ETH / EMB |

(Adaptado de BRASIL, 2002a)

Em todos os esquemas, a medicação é de uso diário e deve ser administrada de preferência em uma única tomada. Considera-se “sem tratamento anterior” ou “virgem de tratamento” (VT), os pacientes que nunca se submeteram à quimioterapia anti-TB ou a fez por apenas 30 dias; “retratamento” é a prescrição de um esquema de fármacos para o doente já tratado por mais de 30 dias e a menos de 5 anos, que venha a necessitar de nova terapia por recidiva após cura, retorno após abandono ou por falência dos E-1 e E-1R; “falência” é a persistência da positividade do escarro ao final do tratamento ou os casos em que no início do tratamento são fortemente positivos e mantém essa situação até o 4º

mês de tratamento, ou aqueles que são positivos no início, tornam-se negativos e voltam a positivar a partir do 4º mês de tratamento. Nos casos de falência do esquema 3, considera-se a possibilidade de tratar-se de TB-MDR e os doentes são encaminhados para unidades de referência para o devido acompanhamento de regimes especiais, com esquemas de tratamento adequados de fármacos alternativos (BRASIL, 2002a).

Fármacos como cicloserina, ácido para-aminosalicílico, tiacetazona, canamicina, capreomicina, viomicina, amicacina e fluoroquinolonas são usados como agentes secundários ou alternativos para tratar infecções causadas por linhagens resistentes aos fármacos comumente utilizados (RAMASWAMY & MUSSER, 1998).

1.2 RESISTÊNCIA NA TUBERCULOSE

O aparecimento de resistência em isolados de *M. tuberculosis* vem acontecendo desde a introdução dos fármacos anti-TB no tratamento, decorrentes da pressão seletiva exercida pelo uso dos fármacos, sobre a população de bacilos que se apresentam mutados espontaneamente para cada fármaco (TOMAN, 1979; ISEMAN, 1994). Epidemiologicamente, a resistência de *M. tuberculosis* aos fármacos verificada nos pacientes com TB pode ser classificada em primária, secundária ou adquirida. A resistência primária é descrita como aquela encontrada em pacientes que nunca receberam tratamento, e a secundária ou adquirida é a que resulta de esquemas terapêuticos inadequados levando à emergência de linhagens resistentes (STEWART *et al*, 1962).

A forma de TB com bacilos resistentes à RMP e INH foi conceitualmente denominada TB-MDR nos EUA e, universalmente aceita a partir da adoção deste conceito pelo CDC em 1992. No Brasil, de acordo com o I Consenso Nacional em Tuberculose (1997) e o Manual de Normas para o Controle da Tuberculose (2000), considera-se um caso multirresistente (TBMR), além do aspecto bacteriológico, o aspecto operacional do controle da doença, pois existe um esquema de reserva para o retratamento de casos (E-1R). A variável bacteriológica consiste na resistência *in vitro* à INH e RMP e a outro fármaco, PZA, EMB e/ou SM. O aspecto operacional diz respeito aos casos de falência

operacional aos esquemas padronizados, E-1 e E-3 (DALCOLMO *et al.*, 1995; FORTES & DALCOLMO, 1997). Quando essa situação acontece, são indicados esquemas especiais com fármacos de segunda linha (alternativos), sob os cuidados de um sistema de Vigilância Epidemiológica da TBMR (BRASIL, 2002a).

Atualmente a resistência medicamentosa na TB é um assunto de grande importância para controlar a doença. Existe a preocupação de que linhagens MDR possam ser espalhadas pelo mundo, salientando a necessidade de mais medidas de controle, tais como os novos métodos diagnósticos, melhores fármacos para o tratamento, e uma vacina mais eficaz. A TB-MDR é um difícil obstáculo para o controle da doença, uma vez que os doentes com estas linhagens realizam tratamentos alternativos envolvendo fármacos de segunda linha que são mais caros, mais tóxicos, e menos eficazes (MARTIN & PORTAELS, 2007; SHI *et al.*, 2007).

Além disso, o problema recentemente introduzido da TB-XDR complicam o controle da doença em nível mundial. TB-XDR, é a TB-MDR com adicional resistência a qualquer fluoroquinolona, e pelo menos uma das três drogas injetáveis capreomicina, canamicina e amicacina utilizadas no tratamento da TB (http://www.who.int/tb/xdr/taskforcereport_oct06.pdf). A TB-XDR agora constitui uma emergente ameaça para o controle da TB e para disseminação da resistência, especialmente em doentes infectados com HIV, como foi recentemente reportado (GANDHI, 2006; RAVIGLIONE & SMITH, 2007). Por este motivo, a detecção rápida da resistência aos fármacos tanto de primeira e como de segunda linha tornou-se um elemento fundamental nos programas controle TB.

A figura 1 representa os países com casos confirmados de TB-XDR no mundo.

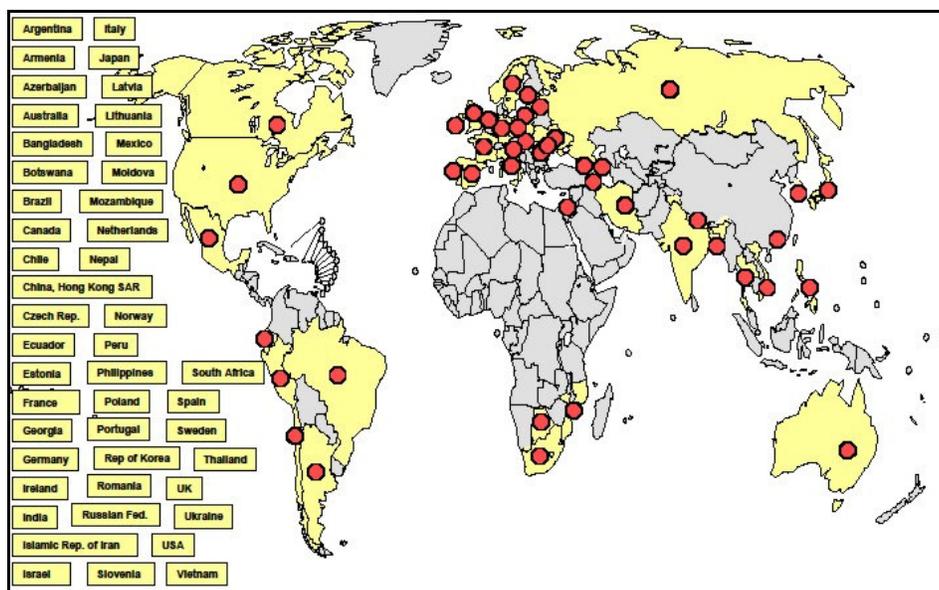


Figura 1. Países com casos confirmados de TB-XDR no mundo – Fevereiro/2008 (www.who.int/tb).

1.2.1 Inquéritos Mundiais de Resistência

Apesar da TB-MDR ser uma das preocupações no controle global da TB não havia dados sobre a magnitude do problema. Por esta razão, a OMS e IUATLD iniciaram em 1994 um projeto global chamado *Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance*. Uma rede de laboratórios-referência nos países participantes garantiu a qualidade dos testes de suscetibilidade realizados pelos laboratórios regionais (LASZLO *et al.*, 1997).

Os objetivos deste projeto desde a sua criação foram sendo ampliados, através das lições aprendidas no período em que vem sendo executado, quanto ao sistema de vigilância, aos dados epidemiológicos, laboratoriais e de resistência que foram disponibilizados através dos relatórios gerados (WHO, 1997; WHO, 2001; WHO, 2004). Estes dados têm auxiliado na identificação das áreas de risco com alta prevalência de resistência aos fármacos, além de fornecer informações sobre as políticas de controle da resistência no mundo.

O primeiro inquérito mundial de resistência ocorreu entre 1994 e 1997. A OMS, IUATLD e vários colaboradores em todo o mundo elaboraram o protocolo do Projeto Global para esse estudo, que abrangeu 35 países em 5 continentes. O objetivo foi medir a prevalência da resistência aos fármacos anti-TB em vários países, utilizando protocolos epidemiológicos e laboratoriais padronizados, e fazendo uma correlação entre as taxas de resistência e o controle do tratamento utilizado nestes países, cobrindo assim uma área de 16% dos casos de TB notificados, no mundo (WHO, 1997). Os resultados deste estudo mostraram que *M. tuberculosis* resistente está presente em todas as áreas geográficas estudadas e também apontaram para o problema de TB-MDR em regiões como: Argentina, República Dominicana, Estônia, Letônia, Costa do Marfim e Ivanovo Oblast (Rússia), onde a prevalência é maior que 3% entre os casos novos de TB (WHO, 2000; ESPINAL *et al.*, 2001). Nas Américas, o foco principal foi a República Dominicana, onde a prevalência de resistência primária a qualquer fármaco é de 41% e de 6,6% para TB-MDR.

Também foi demonstrado que a prevalência de resistência a múltiplos fármacos entre pacientes novos geralmente era baixa, sendo o valor médio em torno de 1%, especialmente na África. Entretanto, várias zonas de risco, isto é, países ou regiões onde a prevalência de resistência a múltiplos fármacos entre os pacientes novos excedia a 3%, foram identificados, particularmente na antiga União Soviética (PABLOS-MÉNDEZ *et al.*, 1997). Na Argentina, a TB-MDR foi detectada como um grave problema, assim como a resistência primária, que chega a 4,6% dos casos de TB (WHO, 1997).

O Brasil participou desse inquérito mundial com uma amostra representativa, de 5.138 isolados, provindos de pacientes atendidos ambulatorialmente, sendo 866 com tratamento anterior para TB e 4.272 sem tratamento prévio. Considerando cada fármaco isoladamente, a taxa de resistência primária foi de 8,5% (INH 4,4%, RMP 1,3%, EMB 0,1% e SM 0,2%), enquanto que, para a associação INH + RMP foi de 0,7%. A taxa de resistência adquirida foi de 21,0% (INH 11,3%, RMP 6,6%, EMB 0,1% e SM 0,8%) e para a associação INH + RMP foi de 5,9% (Tabela 2).

Tabela 2. Inquérito de Prevalência de Resistência no Brasil entre 1995 e 1997.

| | Resistência Primária | | Resistência Adquirida | | Resistência Combinada | |
|-----------------------|----------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|-------|
| | nº | % | nº | % | nº | % |
| PACIENTES ESTUDADOS | 4.272 | 83,1 | 866 | 16,9 | 5.138 | 100,0 |
| PACIENTES SUSCETÍVEIS | 3908 | 91,5 | 684 | 79,0 | 4592 | 89,4 |
| QUALQUER RESISTÊNCIA | 364 | 8,5 | 182 | 21,0 | 546 | 10,6 |
| ISONIAZIDA (INH) | 10 | 4,4 | 16 | 11,3 | 26 | 7,0 |
| RIFAMPICINA (RMP) | 3 | 1,3 | 9 | 6,6 | 12 | 3,3 |
| ETAMBUTOL (EMB) | 2 | 0,1 | 1 | 0,1 | 3 | 0,1 |
| ESTREPTOMICINA (SM) | 8 | 0,2 | 6 | 0,8 | 14 | 0,3 |
| MONORESISTÊNCIA | 269 | 6,3 | 93 | 10,7 | 362 | 7,0 |
| ISONIAZIDA (INH) | 158 | 3,7 | 57 | 6,6 | 215 | 4,2 |
| RIFAMPICINA (RMP) | 8 | 0,2 | 10 | 1,2 | 18 | 0,4 |
| ETAMBUTOL (EMB) | 3 | 0,1 | 1 | 0,1 | 4 | 0,1 |
| ESTREPTOMICINA (SM) | 100 | 2,3 | 25 | 2,9 | 125 | 2,4 |
| MULTIRESISTÊNCIA | 45 | 1,1 | 68 | 7,9 | 113 | 2,2 |
| INH+RMP | 31 | 0,7 | 51 | 5,9 | 82 | 1,6 |
| INH+RMP+EMB | 1 | 0,0 | 1 | 0,1 | 2 | 0,0 |
| INH+RMP+SM | 11 | 0,3 | 15 | 1,7 | 26 | 0,5 |
| INH+RMP+EMB+SM | 2 | 0,1 | 1 | 0,1 | 3 | 0,1 |
| OUTROS PADRÕES | 50 | 1,2 | 21 | 2,4 | 71 | 1,4 |
| INH+EMB | 3 | 0,1 | 1 | 0,1 | 4 | 0,1 |
| INH+SM | 45 | 1,1 | 20 | 2,3 | 65 | 1,3 |
| INH+EMB+SM | 1 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 0,0 |

(Adaptado de BRAGA *et al.*, 2003)

Foi observada a diferença entre as taxas de resistência combinada (primária + adquirida) e de resistência a múltiplos fármacos (INH + RMP e/ou EMB, SM) entre os pacientes não tratados previamente (1,1%) e os já tratados (7,9%), mostrando a importância do uso prévio dos fármacos no desenvolvimento da resistência (WHO, 1997; PABLOS-MENDEZ *et al.*, 1998). Nesse estudo, quando analisadas as regiões geográficas do Brasil, as taxas de resistência primária, foram de 10,6%, 6,3%, 9,9%, 9,3% e 9,2% para Norte, Nordeste, Centro Oeste, Sudeste e Sul, respectivamente (BRAGA *et al.*, 2003).

O segundo estudo global de resistência foi realizado entre 1996 e 1999, com 58 áreas geográficas, completando assim uma cobertura mundial de 33% da população e de 28% dos casos de TB (WHO, 2000b). Ainda desta vez os resultados mostraram que o problema da TB-MDR continua sendo de algumas áreas geográficas do mundo: Estônia (14,1%), Província de Henan, China (10,8%), Letônia (9,0%), Ivanovo Oblast, (9,0%), Tomsk Oblast, Rússia (6,5%), República Islâmica do Iran (5,0%), Província de Zhejiang, China (4,4%), Moçambique (3,5%) e Tamil Nadu State, Índia (3,4%).

Isto confirma que os países que não são capazes de garantir um gerenciamento correto e econômico dos seus regimes de tratamento com os fármacos de primeira linha, não terão condições de controlar seus casos de TB-MDR, usando fármacos de segunda linha, enquanto não forem implementadas as estratégias corretas de controle da TB (WHO, 2000a; ESPINAL *et al.*, 2001). A análise dos resultados dos dois estudos indica que as taxas medianas de TB-MDR primária, que foram de 1% (0% a 14,1%) no primeiro estudo e de 1,4% (0% a 14,4%) no segundo estudo, e de TB-MDR adquirida, que foram de 9,3% (0% a 48,2%) no primeiro estudo e de 13% (0% a 54%) no segundo estudo, não modificaram significativamente, indicando que as taxas de TB-MDR preocupam porque são elevadas, alertando para a necessidade de incrementar ações de prevenção e tratamento, nestas áreas (BRAGA *et al.*, 2003).

Outras conclusões observadas nos dois primeiros relatórios foram que a TB resistente estava presente em todos os locais investigados (países ou regiões), que a TB-MDR estava presente na maioria deles e que boas práticas de controle da TB foram associadas com baixos níveis de resistência ou diminuição destes níveis.

Na terceira fase do projeto foram avaliados 77 regiões ou países, entre os anos de 1999 e 2002, representando 20% do total global de casos novos com baciloscopia positiva. Foram incluídas 39 regiões não estudadas previamente e observou-se que a prevalência de resistência a pelo menos um antimicrobiano variou de 0% em alguns países da Europa Ocidental a 57,1% no Cazaquistão (média = 10,2%). A média de prevalência de resistência aos fármacos específicos

foi 6,3% para SM, 5,9% para INH, 1,4% para RMP e 0,8% para EMB (WHO, 2004).

A prevalência de MDR variou de 0% em oito países a 14,2% no Cazaquistão (51/359) e em Israel (36/253). As maiores prevalências foram observadas em Tomsk, Rússia (13,7%), Karakalpakstan, Uzbequistão (13,2%), Estônia (12,2%), Província de Liaoning, China (10,4%), Lituânia (9,4%), Letônia (9,3%), Província de Henan, China (7,8%) e Equador (6,6%) (WHO, 2004). As causas do aumento da prevalência de resistência podem ser: (i) políticas de controle da TB inadequadas, (ii) imigração de pacientes de áreas com resistência elevada, (iii) epidemias de TB resistente.

1.2.2 Fatores Associados com o Desenvolvimento da Resistência

O surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* resistente a vários fármacos na população está associado a diversos fatores. Em muitos países, os fatores que afetam negativamente os programas de controle da TB incluem a falta de um esquema terapêutico padronizado, a deficiência na sua implementação e manutenção, escassez no fornecimento dos fármacos em áreas com inadequados recursos ou instabilidade política. O uso de fármacos anti-TB de baixa qualidade é uma preocupação adicional. O desenvolvimento de resistência pode envolver também uma seleção inapropriada do esquema terapêutico, algumas vezes devido o desconhecimento de um tratamento anterior, a ignorância sobre a importância de esquemas padronizados e erros como prescrição de um único fármaco (WHO,1997; ESPINAL *et al*, 2001). Outro fator importante é a não adesão do paciente ao tratamento prescrito o que, freqüentemente, é uma fonte de isolados resistentes às drogas. O tratamento tem uma duração de 6 meses, considerada longa se comparada com o tratamento de outras infecções bacterianas, cujo tratamento não dura mais de uma ou duas semanas (ZHANG, 2005).

1.2.3 Mecanismos de Resistência de *M. tuberculosis* aos Fármacos

O desenvolvimento de resistência pelos microrganismos é uma resposta evolucionária à pressão seletiva dos antimicrobianos. De modo geral, os microrganismos vêm desenvolvendo inúmeros mecanismos de resistência que impossibilitam a ação dos fármacos (MCKEEGAN *et al*, 2002). Entre eles pode-se citar: (i) Degradação ou inativação de drogas, quando o microrganismo produz enzimas que destroem a droga ativa; (ii) Modificação do alvo da droga ou nos ativadores dos pró-fármacos, ocorre quando o microrganismo altera a estrutura alvo da droga ou que ativaria este fármaco; (iii) Modificação de vias metabólicas envolvidas na ativação da droga, quando o microrganismo desenvolve uma via metabólica alterada que transpassa a outra reação necessária para a ativação da droga; (iv) Envoltório celular como uma barreira à entrada de drogas, ocorre quando a célula *per se* é uma barreira à entrada de drogas ou quando o microrganismo altera sua permeabilidade, diminuindo a permeabilidade às drogas, aparentemente devido a uma mudança na membrana externa; (v) Mecanismos de efluxo, o microrganismo desenvolve resistência, pois, proteínas de membrana causam a extrusão de drogas (NIKAIDO, 1998; ZHANG & TELENTI, 2000).

M. tuberculosis é naturalmente resistente a muitos antibacterianos, particularmente aqueles derivados β -lactâmicos, os macrolídeos ou as tetraciclinas, tornando difícil o tratamento da TB (COLE & TELENTI, 1995). Esta resistência é devido principalmente ao envelope celular altamente hidrofóbico, que atua como uma barreira, com permeabilidade reduzida para um grande número de compostos (BRENNAN & DRAPER, 1994; DE ROSSI, 2006). Outros determinantes da resistência são codificados no genoma, como as enzimas hidrolíticas ou fármaco-modificadoras como as β -lactamases e acetil aminoglicosídeos transferases, assim como os sistemas de efluxo de fármacos (COLE *et al*, 1998).

Diferente do que acontece em muitas bactérias, *M. tuberculosis* não realiza uma transferência horizontal de genes, isto é, aquisição de resistência através de elementos móveis. O desenvolvimento da infecção por *M. tuberculosis*, devido a

sua característica específica, que desde a entrada no indivíduo e sua permanência como forma latente não mantém contato com outras linhagens, não permite a oportunidade de trocas de informações genéticas de determinantes de resistência contidas em plasmídeos ou transposons através de transdução ou transformação, comuns em outras bactérias que permanecem colonizando sítios como o trato gastrointestinal ou nasofaríngeo. A resistência apresentada por *M. tuberculosis* aos fármacos anti-TB é uma amplificação artificial do fenômeno natural de mutações espontâneas. Assim a resistência ocorre através de mutações cromossômicas, que são alterações na seqüência do DNA bacteriano que se refletem nas proteínas envolvidas com a ligação aos fármacos (GILLESPIE, 2002).

As mutações genéticas, associadas com a resistência, podem ser pontuais, envolvendo modificações em um único par de bases do DNA, por substituição, adição ou deleção de apenas um nucleotídeo. Esses eventos mutacionais, podem ser o resultado de um funcionamento precário do sistema celular que replica ou repara o DNA, inserindo uma base errada na seqüência de nucleotídeos que está sendo formada ou pode ser o resultado da interferência química diretamente sobre a base. Essas modificações nos nucleotídeos podem ou não alterar o aminoácido codificado pela trinca de nucleotídeos (códon) (PASSAGLIA, 2000).

O mecanismo clássico pelo qual a mutação confere resistência é aquele que ocorre no gene que codifica para o alvo do fármaco, geralmente uma enzima, cuja inibição representa um efeito tóxico sobre o fármaco, diminuindo a habilidade do fármaco se ligar à enzima. Outro tipo de mutação não altera a proteína alvo, mas simplesmente aumenta sua expressão, havendo assim maior quantidade de proteína do que o fármaco é capaz de inibir. Há um tipo de mutação que também pode produzir resistência, diminuindo o acúmulo do fármaco dentro da célula, quer por dificultar sua entrada ou por acelerar sua remoção da célula. A modificação química que inativa o fármaco, também é um mecanismo de resistência (TAKIFF, 2000).

O mecanismo de resistência a múltiplos fármacos anti-TB, devido a mutações espontâneas, ainda é desconhecido, pois não se identificou um único gene envolvido na multirresistência. O fenótipo multidroga resistente observado

em isolados clínicos deve-se à aquisição seqüencial de mutações em diferentes genes. (ISEMAN, 1993; WHO, 1997; COLL, 2003). Por exemplo, a probabilidade de uma mutação espontânea resultar em resistência à INH e RMP é o produto das probabilidades individuais, isto é, 1 em 10^{14} ($10^6 \times 10^8$). Este é um fato decisivo para o esquema de múltiplos fármacos no tratamento da TB. Entretanto, em uma população bacteriana já resistente à INH, pode ocorrer mutação espontânea, resultando na resistência à RMP, em alguns bacilos. Uma seqüência similar pode levar à resistência a outras combinações de fármacos, e eventualmente a todos os fármacos utilizados no tratamento da TB (ISEMAN, 1993; WHO, 1997).

Durante a infecção, nas cavidades pulmonares, a população micobacteriana é de 10^7 a 10^9 bacilos (CANETTI, 1965). A resistência à isoniazida e estreptomicina desenvolve-se a uma taxa de 10^{-7} , enquanto que a resistência a rifampicina desenvolve-se, freqüentemente, a uma taxa de 10^{-9} . Isso implica que cada paciente com TB pode abrigar bacilos que são separadamente resistentes aos fármacos anti-TB. Por essa razão, a TB deve ser tratada com uma terapia utilizando múltiplos fármacos (GILLESPIE, 2002). A detecção precoce da resistência aos fármacos anti-TB é essencial para o correto controle da TB resistente (COLL, 2003).

1.2.4 Mecanismo de Ação e Resistência dos Fármacos Anti-TB

Rifampicina

A RMP é um agente antimicrobiano de largo espectro que se difunde rapidamente através do envelope hidrofóbico da célula (COLE, 1995; ZHANG & TELENTI, 2000). Atua inibindo a transcrição do DNA em RNAm através da interação com a subunidade β da enzima RNA polimerase. Além do efeito bactericida sobre as células de *M. tuberculosis* metabolicamente ativas, a RMP também possui uma ação esterilizante excelente frente às bactérias em estado de latência. Por isso, a RMP fez com que a terapia frente à TB fosse reduzida de 12-18 meses para 6 meses (ZHANG, 2005). As micobactérias adquirem resistência a

RMP por mutações em uma região bem definida de 81 pares de bases (27 códons) da região central do gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase, o gene *rpoB*. Mais de 95% das linhagens resistentes a RMP possuem mutações nessa região. Este fato facilitou o desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção rápida da resistência a RMP (COLE & TELENTI, 1995). Em 5-10% das linhagens resistentes a RMP não é relatado mutações no gene *rpoB*, e nessas linhagens é possível que ocorra uma variação no número e atividade de bombas de efluxo (VIVEIROS *et al.*, 2003). A CMI para linhagens sensíveis varia de 0,1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (SILVA & AÍNSA, 2007).

Pirazinamida

A PZA tem sido usada juntamente com a INH e RMP, devido ao seu forte sinergismo com esses fármacos, fazendo com que o tempo de duração do tratamento fosse reduzido de 9 para 6 meses. Sua atividade *in vivo* é em meio ácido (pH = 5,5) e por isso tem ação sobre os bacilos de *M. tuberculosis* semidormentes localizados nos focos inflamatórios no interior dos macrófagos (SCORPIO *et al.*, 1997). A PZA é um pró-fármaco e é convertido em sua forma ativa, o ácido pirazinóico, pela enzima micobacteriana pirazinamidase (ZHANG, 2005). Esta enzima é codificada pelo gene *pncA* e mutações neste gene têm sido associadas à resistência a este fármaco, com uma frequência de 72 a 97%. A PZA se difunde para o interior do macrófago, onde se converte em ácido pirazinóico, que se acumula no interior da célula, pois *M. tuberculosis* tem um sistema de efluxo deficiente para este ácido. O ácido pirazinóico atua sobre a enzima-alvo, FAS I (*Fatty Acid Synthetase I*), inibindo a síntese de ácidos graxos, pois acidifica o pH intracelular abaixo do tolerado pela enzima. No entanto, existem linhagens resistentes a PZA sem alterações no gene *pncA* e nestas linhagens a resistência deve-se a outros mecanismos relacionados com a permeabilidade e o efluxo. A CMI para linhagens sensíveis é de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (COLL, 2003).

Etambutol

O EMB atua inibindo a biossíntese de lipoarabinomananos e arabinogalactanos que são importantes polissacarídeos da parede celular micobacteriana. É ativo somente contra bactérias em multiplicação (AÍNSA *et al.*, 2001). A resistência ao EMB está associada a mutações no operon *embCAB*, que codifica a enzima arabinosil transferase (*EmbC*, *EmbA* e *EmbB* em *M. tuberculosis*), relacionada com a síntese de componentes da parede celular (COLL, 2003). Mutações em *embB*, identificadas em mais de 65% dos isolados clínicos são associadas com alto nível de resistência. Baixos níveis de resistência, achado em 35% das linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a EMB, não apresentam mutações no gene *embB* (ZHANG & TELENTI, 2000). A CMI para linhagens sensíveis é de 1 a 5 µg/mL (COLL, 2003).

Estreptomicina

A SM é um aminoglicosídeo que interfere na síntese protéica, bloqueando a tradução do RNA mensageiro. Para as micobactérias, o mecanismo de resistência se dá por mutações no alvo do fármaco, os ribossomos. O principal sítio de mutações é o gene *rpsL*, que codifica a proteína ribossomal S12, cuja frequência de ocorrência está em torno de 59% das linhagens resistentes e produzem CMIs altas (> 500 µg/mL). Outro mecanismo de resistência ocorre por mutações no gene *rrs* que codifica o RNA16S e se observam em 21% das linhagens resistentes, com CMI intermediária (50 – 500 µg/mL). Para um terço das linhagens resistentes existe um nível de resistência baixo (CMI 25 – 50 µg/mL) e não foram encontradas alterações nos genes *rrs* e *rpsL*, sugerindo um mecanismo de permeabilidade da micobactéria. A CMI para linhagens sensíveis é de 8 µg/mL (ROSSETTI *et al.*, 2002; COLL, 2003).

1.3 ISONIAZIDA: MECANISMO DE AÇÃO E RESISTÊNCIA EM *M. tuberculosis*

1.3.1 Aspectos Gerais

A INH ou hidrazida do ácido isonicotínico é o mais antigo fármaco sintético efetivo contra *M. tuberculosis* e um dos principais quimioterápicos de primeira linha no tratamento da TB (HEYM *et al.*, 1999; METCALFE *et al.*, 2008). A CMI de linhagens sensíveis é muito baixa, entre 0,02 e 0,05 µg/mL, o que foi considerado um marco na quimioterapia da TB (MIDDLEBROOK, 1952; HEYM *et al.*, 1999). A sua elevada potência pode ser justificada pelo fármaco possuir diversos alvos na célula micobacteriana, apresentando também excelente atividade contra as espécies do complexo *M. tuberculosis*, mas pouca ou nenhuma atividade contra as micobactérias não tuberculosas (HEYM *et al.*, 1999). Estruturalmente, a INH é um derivado sintético do ácido isonicotínico, apresenta um anel de pirimidina e um grupo hidrazida, sendo ambos essenciais para a sua atividade (figura 2). O seu mecanismo de ação é um dos mais complexos de todos os antimicrobianos (ZHANG *et al.*, 1992).

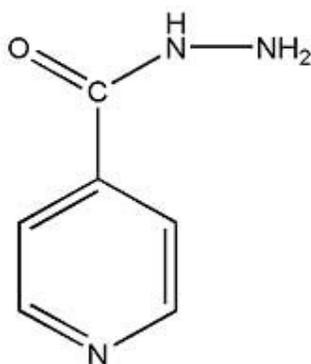


Figura 2. Fórmula estrutural da Isoniazida (SILVA & AÍNSA, 2007).

A INH é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e o pico de concentração de 3 a 8 µg/mL é alcançado em 1 ou 2 horas após a dose oral de 300 mg. A distribuição do fármaco ocorre amplamente nos diversos tecidos e fluidos corporais, incluindo o líquido cefalorraquidiano. A meia-vida plasmática

varia de 1 a 6 horas. É metabolizada no fígado e intestino e excretada na urina (SILVA & AÍNSA, 2007).

A INH é o fármaco de escolha para o tratamento e quimioprevenção da TB porque, após três horas de sua administração, a CMI no sangue para os bacilos da tuberculose é de 50 a 90 vezes maior que a necessária para matá-los. Além disso, ela tem forte poder bactericida associado à ação esterilizante. É o fármaco com menos efeitos colaterais indesejáveis e o de menor custo dentre os utilizados no tratamento da TB. Na atualidade, há um consenso de que a quimioprevenção deve ser dirigida aos grupos de alto risco de TB, entre estes, especialmente, os co-infectados por HIV/TB (BRASIL, 2002a).

1.3.2 Mecanismo de Ação da INH em *M. tuberculosis*

A INH entra na célula micobacteriana através de difusão passiva (BARDOU *et al.*, 1998). É considerada uma pró-droga que, antes de exercer o efeito tóxico no bacilo, requer a ativação para uma forma ativa. Sabe-se que a catalase-peroxidase bacteriana (KatG) é a enzima responsável pela sua ativação (ZHANG *et al.*, 1992; METCALFE *et al.*, 2008) e gera radicais reativos que atacam vários alvos em *M. tuberculosis* (ZHANG & TELENTI, 2000). Evidências sugerem que o principal alvo deste fármaco é a inibição da biossíntese dos ácidos micólicos que compõem a parede celular, fazendo com que a bactéria torne-se suscetível aos radicais de oxigênio e outros fatores do meio (KREMER *et al.*, 1997; ROSSETTI *et al.*, 2002; TIMMINS & DERETIC, 2006). O metabolismo normal de ácidos micólicos é crucial para a sobrevivência de *M. tuberculosis*, uma vez que são considerados os componentes-chaves da parede celular micobacteriana por formar uma barreira efetiva para a penetração de antimicrobianos (KREMER *et al.*, 1997). Além disso, pelo menos duas enzimas, também envolvidas na síntese dos ácidos micólicos, a InhA (enoil-ACP redutase) e a KasA (β -cetoacil ACP sintetase), foram identificadas como alvos da INH (ZHANG, 2005).

1.3.3 Bases Moleculares da Resistência de *M. tuberculosis* à INH

Logo após a introdução da INH no tratamento da TB, tornou-se claro e evidente a sua relação com a resistência. Somente após 40 anos, tal resistência foi esclarecida através da identificação do gene *katG*, codificador da enzima KatG de *M. tuberculosis*, o qual é indispensável para a susceptibilidade à INH (ZHANG *et al.*, 1992).

A resistência à INH parece estar associada a uma variedade de mutações que afetam um ou mais genes, como os que codificam a enzima KatG (*katG*) (ZHANG *et al.*, 1992); a enzima enoil-ACP redutase envolvida na biossíntese dos ácidos micólicos (*inhA*) (BANERJEE *et al.*, 1994); a alquil hidroperóxido redutase envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo (*ahpC*) (WILSON & COLLINS, 1996); a enzima β -cetoacil ACP sintetase também envolvida na biossíntese dos ácidos micólicos (*kasA*) (MUDLULI *et al.*, 1998) e a enzima NAD desidrogenase (*ndh*), na qual o mecanismo de resistência é pouco compreendido (LEE *et al.*, 2001).

Os mecanismos genéticos determinantes da resistência à INH parecem ocorrer em diferentes níveis: (i) bloqueio da ativação do fármaco, relacionado com o gene *katG*, (ii) inativação do intermediário tóxico da INH, atividade associada com o gene *ahpC*, (iii) bloqueio da biossíntese do ácido micólico (*inhA* e *kasA*) (ZHANG & TELENTI, 2000).

A ocorrência de mutações, associadas com resistência, nos genes *katG* e *inhA* são encontradas em 75-85% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à INH (ALTAMIRANO *et al.*, 1994; MUSSER, 1995).

No Brasil, um estudo realizado por SILVA *et al.* (2003) buscou caracterizar as mutações encontradas nos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à INH de diferentes regiões. Este estudo observou mutações pontuais no códon 315 do gene *katG* em 87,1, 60,9, e 60% nos isolados do Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, e São Paulo, respectivamente. Mutações no gene *inhA* foram identificadas em apenas um isolado no estado do Rio de Janeiro, e a região promotora do gene *ahpC* revelou mutações em posições distintas em 12,9, 21,7 e 6,7% nos isolados do RS, RJ e SP, respectivamente. Uma pequena proporção de

linhagens resistentes não apresentou mutações nos genes *katG*, *inhA* ou *ahpC*, indicando que provavelmente outros genes estariam envolvidos com a resistência à INH. Os resultados deste estudo demonstraram que a maioria dos isolados resistentes exibiu mutações pontuais e que o MIC, em 59,4% dos isolados, apresentou altos níveis de resistência ($\geq 16\mu\text{g/mL}$) à INH. Também não foi encontrada nenhuma relação epidemiológica entre os padrões de RFLP e a resistência dos isolados de *M. tuberculosis* com alteração no códon 315 (*katG*), sendo que esta heterogeneidade foi observada através do padrão obtido no RFLP.

O estudo de CARDOSO *et al.* (2004) caracterizou isolados de *M. tuberculosis* do estado de SP e do PR através de PCR-SSCP e seqüenciamento e observou mutações no códon 315 do gene *katG* em 61,9% dos isolados. Também foram encontrados 10,3% dos isolados com mutações em *ahpC*, 25,8% no *inhA* regulamentar e 6,2% no *inhA* estrutural. HOFLING *et al.* (2005) utilizou as mesmas técnicas e observou a substituição S315T no gene *katG* em 60,4% dos isolados provenientes do estado de SP.

Outro estudo realizado por DALLA COSTA (2008) buscou caracterizar as mutações envolvidas na resistência à INH em isolados de *M. tuberculosis* do Brasil, Argentina e Peru. Mutações no gene *katG* foram observadas em 73,9% dos isolados, sendo que 72,7% apresentaram mutação no códon 315. Também foram encontrados 8,4% dos isolados com mutações em *ahpC*; 12,0% no *inhA* regulamentar e 1,2% dos isolados em *inhA* estrutural. Os resultados deste estudo sugerem uma associação entre níveis maiores de CMI *in vitro* para INH e a mutação S315T.

1.3.4 Gene *katG* e a Resistência à INH

MIDDLEBROOK (1954) observou que vários isolados clínicos perdem a atividade catalase-peroxidase e conseqüentemente, desenvolvem resistência à INH em *M. tuberculosis*. Baseados nessas observações, ZHANG *et al.* (1992, 1993) realizaram a clonagem e o seqüenciamento do gene *katG*, possibilitando assim, a identificação de mutações como origem para a resistência em isolados

clínicos resistentes. Além disso, também foram identificadas deleções neste gene em duas linhagens que mostraram ser altamente resistentes ($MIC > 50 \mu\text{g/mL}$). No entanto, em estudos posteriores realizados por MARTTILA *et al.* (1998), mostraram que em linhagens resistentes, as substituições de aminoácidos são mais freqüentes do que as deleções, indicando que deleções neste gene apresentam-se raramente. A demonstração de que mutações em *KatG* causam resistência, foi verificada pela restauração da linhagem sensível à INH para linhagens resistentes, através da transformação com um gene *katG* funcional (ZHANG *et al.*, 1993).

O fato do gene *katG* estar localizado em uma região altamente variável do genoma de *M. tuberculosis*, onde encontram-se seqüências repetidas de DNA, faz com que esta região torne-se instável e, possivelmente contribua para a alta freqüência de mutações neste gene em linhagens resistentes à INH (ZHANG & TELENTI, 2000).

Análises realizadas em isolados de pacientes resistentes à INH de *M. tuberculosis* mostraram a notável correlação entre a resistência e a perda da atividade da catalase-peroxidase (ZHANG *et al.*, 1992, HEYM *et al.*, 1993).

A catalase-peroxidase consiste de duas subunidades idênticas de 80 kDa e, por ser uma proteína com atividade catalítica bifuncional, converte $2\text{H}_2\text{O}_2$ para $2\text{H}_2\text{O}$ através da sua função de catalase. Por outro lado, a sua atividade peroxidase recebe elétrons de doadores orgânicos e os utiliza para reduzir $2\text{H}_2\text{O}_2$ para H_2O . A atividade peroxidase parece ser necessária na ativação da INH para uma substância tóxica à célula bacteriana, porém o mecanismo como isto acontece é ainda pouco compreendido (ZHANG & YOUNG, 1993).

Investigações em diferentes regiões do mundo têm demonstrado que a resistência à INH está freqüentemente associada com mutações em *katG*, indicando que deleções neste gene são raras, mas não impossíveis. A observação de que muitas linhagens de *M. tuberculosis* resistentes à INH não apresentavam uma inteira deleção do *katG*, estimulou determinadas análises na estrutura deste gene. As investigações demonstraram que muitos dos isolados resistentes apresentam mutações pontuais, pequenas deleções ou inserções que

não são observadas entre linhagens controle sensíveis a este fármaco (RAMASWAMY & MUSSER, 1998; NUSRATH *et al.*, 2008).

As alterações em *KatG* estão representadas entre os organismos resistentes, sendo que as mutações que ocorrem com maior frequência, encontram-se localizadas nos códons 315 (Ser → Thr) e 463 (Arg → Leu).

MUSSER *et al.* (1996) analisaram 85 linhagens resistentes à INH, obtidas de diversas áreas geográficas, onde identificaram alterações na posição 315 em 58% dos isolados, sendo estes sem relação epidemiológica. Da mesma forma, estudos realizados em diversas partes do mundo, mostraram que a substituição no códon 315 é comum nos isolados de *M. tuberculosis* MDR, porém exibem variações em suas frequências.

Em diferentes estudos, a frequência de linhagens resistentes à INH com mutação no códon 315 do gene *katG* variou de 50 a 100% (MUSSER *et al.*, 1996; VAN SOOLIGEN *et al.*, 2000; VAN DOORN *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2003; HILLEMANN *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2007; BOSTANABAD *et al.*, 2008; DALLA COSTA, 2008; GEGIA *et al.*, 2008; NUSRATH *et al.*, 2008; ZAKERBOSTANABAD *et al.*, 2008). Além disso, a substituição de um aminoácido no códon 315 (AGC → ACC / Ser → Thr) foi relatada ser a mais frequente (MDLULI *et al.*, 1996; MUSSER *et al.*, 1996; VAN SOOLIGEN *et al.*, 2000; ABATE *et al.*, 2001; VAN DOORN *et al.*, 2001; MOKROUSOV *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2007; BOSTANABAD *et al.*, 2008; DALLA COSTA, 2008; NUSRATH *et al.*, 2008; ZAKERBOSTANABAD *et al.*, 2008). Mutações no *katG*₃₁₅ diminuem a ativação da INH sem abolir a catalase-peroxidase, um potente fator de virulência (SAINT-JOANIS *et al.*, 1999; PYM *et al.*, 2002; WEI *et al.*, 2003; KAPETANAKI *et al.*, 2005). Esta mutação está associada com o desenvolvimento e transmissão de TB-MDR, enquanto que outras mutações que conferem resistência à INH, como *inhA* -15C → T, não estão (VAN SOOLIGEN *et al.*, 2000; HAZBON *et al.*, 2006; VAN DOORN *et al.*, 2006). Uma possível relação entre esta mutação e sua transmissibilidade foi sugerida em estudos anteriores, em que os pacientes portadores de linhagens com esta foram associados com um risco de transmissão aumentado (ou uma maior progressão da infecção para doença) (VAN

serina; T: treonina; W: triptofano; V: valina. (Adaptada de RAMASWAMY & MUSSER, 1998).

Análises realizadas no gene *katG* mostraram também alterações no códon 463, resultando na substituição de CGG (Arg) → CTG (Leu), sugerindo que esta poderia estar relacionada com a resistência à INH (COCKERILL III *et al.*, 1995; MUSSER *et al.*, 1996).

Assim, a prevalência da mutação *katG*315 demonstra a sua importância no desenvolvimento da resistência à INH em *M. tuberculosis*. Estas observações indicam que esta mutação é um interessante alvo para diagnóstico e outras investigações.

1.4 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ANTI-TB

A detecção precoce da resistência aos fármacos anti-TB constitui uma das prioridades nos programas de controle da TB. Isso permite o início do tratamento adequado e também a vigilância da resistência medicamentosa. Métodos convencionais para a detecção da resistência são baseados no crescimento de *M. tuberculosis* na presença de antimicrobianos. No entanto, devido ao longo período de tempo necessário para obter-se resultados, nos últimos anos novas tecnologias e métodos têm sido propostos. Estes métodos incluem métodos fenotípicos e genotípicos (MARTIN & PORTAELS, 2007).

Os métodos genotípicos têm a vantagem de serem realizados em curto tempo, sem a necessidade de crescimento do organismo (com a possibilidade de aplicação direta em amostras clínicas), apresenta baixo risco biológico, bem como a viabilidade de automação; no entanto, nem todos os mecanismos moleculares de resistência aos fármacos são conhecidos. Os métodos fenotípicos, por outro lado, são em geral simples de executar e com custo acessível, porém são demorados e bastante laboriosos. Podem ser mais facilmente implementados na rotina de laboratórios de micobacteriologia, uma vez que sejam implantados com

os cuidados necessários preconizados pela biossegurança (HEIFETS *et al.*, 1999).

1.4.1 Métodos Fenotípicos

Em geral, os métodos fenotípicos avaliam a inibição do crescimento de *M. tuberculosis* na presença de antimicrobianos para distinguir entre linhagens suscetíveis e resistentes (HEIFETS, 1996). Sendo difícil estabelecer uma definição clínica de resistência, essa é definida, bacteriologicamente *in vitro*, como a diminuição da susceptibilidade de *M. tuberculosis*, em relação a cada fármaco, comparada com a linhagens selvagem, àquela que nunca teve contato com o fármaco (CANETTI *et al.*, 1963).

Os métodos fenotípicos convencionais, que utilizam meios sólidos, para testar a susceptibilidade dos fármacos são: (i) método das proporções; (ii) método da razão de resistência e (iii) método da concentração absoluta (CANETTI *et al.*, 1963; CANETTI *et al.*, 1969) e são recomendados pela OMS e IUATLD. Os métodos com meios de cultura a base de ágar, Middlebrook 7H10 e 7H11, também são utilizados para determinar susceptibilidade aos fármacos anti-TB, e são recomendados pelo CDC (KENT & KUBICA, 1985; ATS, 2000). O método das proporções é o método mais comumente utilizado no mundo entre os três acima mencionados. Ele permite a definição da proporção de mutantes resistentes a um determinado fármaco. Resumidamente, diluições seriadas do bacilo são inoculadas em meio com e sem fármaco (controle). Uma dessas diluições deverá produzir um número de colônias que possa ser contado. O número de colônias obtidas no meio com e sem fármaco são enumerados e a proporção de mutantes resistentes é então calculada. Quando realizado em tubos com meio Löwenstein-Jensen, a primeira leitura do teste será após 28 dias de incubação à 37°C. Se a proporção de bactérias resistentes for superior a 1% para INH, RMP e PAS, ou 10% para os outros fármacos, a linhagem é considerada resistente; caso contrário, o teste é lido novamente em 42 dias de incubação para avaliar se a linhagem é suscetível a um determinado fármaco (HEIFETS, 2000).

O desenvolvimento de sistemas comerciais automatizados ou semi-automatizados, para a detecção do crescimento de micobactérias, radiométricos ou colorimétricos, em tempo menor que o exigido para os convencionais, trouxe maior agilidade aos resultados (HEIFETS & GOOD, 1994). O sistema BACTEC 460 TB (Becton Dickinson) é radiométrico, e oferece uma diminuição de 30% no tempo para obter o resultado (22 dias), quando comparado ao método das proporções em LJ. Porém, este método possui a desvantagem de utilizar material radioativo, além de ter alto custo (KAPPUR *et al.*, 1995; PFYFFER *et al.*, 1999). O sistema MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube - Becton Dickinson) faz parte da "nova geração" de diagnóstico da TB, tanto em sua versão manual, como na versão automatizada BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson). Ambos os testes são colorimétricos (IDIGORAS *et al.*, 2000). Em vários estudos o sistema MGIT, mostrou bons resultados com uma alta correlação com os métodos convencionais em meios sólidos e com o sistema BACTEC 460 TB. (JOHANSEN *et al.*, 2004; RUSCH-GERDES *et al.*, 2006). Outros sistemas automatizados foram utilizados para a detecção rápida da resistência aos fármacos anti-TB em *M. tuberculosis*, mas eles não têm sido utilizados na rotina de laboratórios de micobacteriologia (RUIZ *et al.*, 2000; ANGEBY *et al.*, 2003).

Entre os mais recentes métodos fenotípicos para uma rápida detecção da resistência aos fármacos anti-TB destacam-se o MODS (*Microscopic Observation Broth Drug Susceptibility Assay*), uma metodologia realizada em microplacas com meio líquido (7H9), que depois de 10 dias podem ser observadas no microscópio invertido com filtro para campo escuro para visualizar o fator corda formado pela micobactéria (CAVIEDES *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2002). Outro método para detectar a susceptibilidade de *M. tuberculosis* aos fármacos, e que avalia a sua habilidade em reduzir nitrato em nitrito, usando a enzima nitrato redutase, é o *Nitrate Reductase Assay* (NRA), que utiliza meio de cultura LJ e reagentes especiais que evidenciam a mudança de coloração (ÄNGEBY *et al.*, 2002). SYRE *et al* (2003) modificaram este teste utilizando meio de cultura líquido 7H9 *Colorimetric Nitrate Reductase-based Antibiotic Susceptibility* (CONRAS). Existem também os métodos colorimétricos para determinação da CMI baseado no efeito de uma substância antimicrobiana sobre um microrganismo, através da avaliação

do seu crescimento ou da sua inibição, que pode ser medido por contagem de células em placas, turvação, absorvância e bioluminescência. Tradicionalmente, a quantificação é feita por medida da absorvância em espectrofotômetro. Os sais de tetrazolium e de resazurina, quando adicionados, facilitam a leitura do teste, principalmente quando as células têm a tendência de se aglutinarem como é o caso de micobactérias (GABRIELSON *et al.*, 2002).

1.4.2 Métodos Genotípicos

Avanços em biologia molecular tornaram possíveis investigar os mecanismos genéticos da resistência aos fármacos em *M. tuberculosis* e desenvolver métodos para rápida detecção de mutações associadas à resistência. Atualmente, a maioria dos métodos disponíveis são para detecção de linhagens resistentes à RMP, porque, em *M. tuberculosis*, a maioria das mutações está confinada a uma região pequena do gene *rpoB*. Já para a INH o mesmo não acontece, pois vários genes estão envolvidos com resistência. (WATTERSON & DROBNIEWSKI, 2000; SOINI & MUSSER, 2001).

A principal metodologia utilizada para elucidar mecanismos genéticos de resistência em *M. tuberculosis* é o seqüenciamento do DNA dos produtos amplificados pela PCR. Este permite estudar as mutações através da análise e comparação de uma linhagem selvagem com uma linhagem resistente, onde é possível identificar mutações na linhagem resistente que podem estar relacionadas com a resistência a determinado fármaco. É uma metodologia direta muito sensível, eficaz e permite certeza no resultado, considerada padrão ouro quando se trata de diagnóstico molecular. Porém não é um método aplicável na rotina, pois se torna muito laborioso quando a análise envolve mais de um gene, ou a região do gene a ser analisado é muito ampla, além de ser de custo elevado, pois utiliza aparelhos importados de alto custo (SOINI & MUSSER, 2001).

O método PCR-SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) detecta mutações através de alterações na mobilidade eletroforética de um DNA simplificado visualizado em gel de poliacrilamida (DEAN *et al.*, 1990 apud COCKERILL III, 1999). Existe um padrão de banda para linhagem selvagem que é comparado

com os vários padrões de bandas que aparecem nas linhagens resistentes. (TELENTI *et al.*, 1993a). Nos últimos anos, esta técnica começou ser aplicada como *screening* na identificação de mutações de ponto no genoma de *M. tuberculosis* associadas com a resistência à RMP (gene *rpoB*), (TELENTI *et al.*, 1993b), INH (gene *katG*) (ROUSE *et al.*, 1995), entre outros. Entretanto, uma das limitações desta análise é que o tamanho do produto amplificado por PCR é um fator crítico para resolver as diferenças de um DNA simples-fita desnaturado, já que esta metodologia se torna mais discriminatória quando os fragmentos amplificados são menores que 400 pb. Outro aspecto a ser considerado é que os segmentos de DNA que apresentam um perfil eletroforético anormal devem ser seqüenciados para confirmar se realmente ocorreu alguma alteração entre nucleotídeos e, se ocorreu, qual foi a substituição encontrada (FLUIT *et al.*, 2001).

A análise por PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) é utilizada na identificação de mutações associadas com a resistência antimicrobiana. Vários pesquisadores têm mostrado, através de suas publicações, que duas das mutações que ocorrem com freqüência no gene *katG*, localizadas nos códons 315 e 463, podem ser identificadas através do uso da endonuclease de restrição *MspI* (MARTILLA *et al.*, 1996; HAAS *et al.*, 1997). Dependendo da mutação, diferentes fragmentos são gerados quando os produtos de PCR do gene *katG* são digeridos por esta endonuclease e, comparados com o amplicon de uma linhagem selvagem. No caso do códon 315 estes fragmentos resultam em um ganho de um sítio de restrição para *MspI* ou a perda de um sítio de restrição para o códon 463.

Uma metodologia baseada na análise de regiões mutadas através de um padrão estabelecido por um chip de computador é conhecida como *DNA-Microarrays* ou “chips” de DNA. A visualização do resultado se dá através de uma combinação de cores que indica o que está mutado e o que tem padrão selvagem. Esta técnica tem sido utilizada para detectar a resistência à INH e RMP. Este método é rápido e eficiente, porém requer um pessoal experiente, além de um alto custo devido ao equipamento importado (GRYADUNOV *et al.*, 2005).

A técnica de PCR Real-Time tem sido recentemente utilizada para detecção rápida da resistência em TB (SHAMPUTA *et al.*, 2004). Esta tem sido aplicada a linhagens de *M. tuberculosis* e, mais recentemente, diretamente de amostras clínicas. As maiores vantagens desta técnica são a rapidez nos resultados (2hs após a extração do DNA) e o baixo risco de contaminação. Porém, esta requer reagente e equipamento de alto custo (SAJDUDA *et al.*, 2004; ESPASA *et al.*, 2005).

Atualmente, há dois testes de hibridização disponíveis comercialmente para a detecção rápida da resistência aos fármacos anti-TB: INNO-LiPA Rif TB (Innogenetics, Ghent, Bélgica) para a detecção da resistência à RMP e o GenoType MTBDR $plus$ (Hain Lifesciences, Nehren, Alemanha), para a detecção simultânea da resistência à INH e RMP. Estes testes têm um custo extremamente elevado e não estão disponíveis no Brasil.

O INNO-LiPA Rif TB é baseado no princípio da hibridização de fase sólida reversa, onde o produto amplificado da cultura de *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* de *M. tuberculosis* (SOINI & MUSSER, 2001). Este método é sensível, de fácil execução, não tóxico, fornecendo um resultado rápido que é visualizado através de sinais que aparecem na membrana depois de uma reação enzimática colorimétrica (ROSSAU *et al.*, 1997). Muitos estudos foram realizados sobre a aplicação do INNO-LiPA na detecção da resistência à RMP em isolados de *M. tuberculosis* e apenas alguns diretamente de amostras de escarro (JUREEN *et al.*, 2004; TRAORE *et al.*, 2006). Em uma recente revisão de estudos que aplicaram esta técnica, 12 de 14 estudos realizados em isolados de *M. tuberculosis* tiveram uma sensibilidade superior a 95% e especificidade de 100%. Quatro estudos aplicaram diretamente em amostras clínicas e tiveram especificidade de 100%, e a sensibilidade variou de 80% a 100% (MORGAN *et al.*, 2005). Em outro estudo não incluído na revisão anterior, o INNO-LiPA foi avaliado para detecção de resistência à RMP em 420 amostras de escarro provenientes de diferentes países e houve uma concordância de 99,6% comparado com a cultura (TRAORE *et al.*, 2006).

O teste GenoType MTBDR permite a identificação genética do complexo *M. tuberculosis* e da resistência à RMP e/ou INH a partir de amostras cultivadas ou diretamente de material pulmonar do paciente com microscopia positiva. A identificação da resistência à RMP é facultada pela detecção das mutações mais significativas do gene *rpoB*. Para testar o nível elevado de resistência à INH é examinado o gene *katG*, mais especificamente o códon 315. Para esse códon o teste apresenta uma sonda selvagem e duas sondas mutadas (uma com a mutação mais freqüente ACC e a outra com a mutação ACA, ambas Ser → Thr). Recentemente, 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* biotinizados e uma hibridização reversa. A hibridização inclui os passos de desnaturação dos produtos de amplificação, hibridização dos amplicons, marcados com biotina, a sondas ligadas à membrana, lavagem adstringente, adição de um conjugado streptavidina/fosfatase alcalina (AP), e uma reação de produção de cor mediada pela AP. Além de sondas mutadas e selvagens designadas para estes genes, 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*. (http://www.hainlifescience.com/pdf/304xx_pbl.pdf). Um estudo avaliou o GenoType MTBDR em 143 isolados de *M. tuberculosis*, este identificou 102 de 103 (99%) das linhagens com mutações no gene *rpoB* e 91 de 103 (88,4%) com mutações no códon 315 do gene *katG*. A concordância com os resultados obtidos no seqüenciamento dos DNAs foi de 100%, e a sensibilidade e especificidade obtidas foram bastante significativas quando comparado aos testes convencionais de susceptibilidade aos antimicrobianos (HILLEMANN *et al.*, 2005). Existem poucos estudos que abordam a aplicação desta técnica diretamente de amostras de escarro. No estudo de HILLEMANN *et al* (2006), o GenoType MTBDR foi testado diretamente em 42 amostras de escarro com microscopia positiva e foi obtido uma

concordância de 100% quando comparado aos testes convencionais de susceptibilidade aos antimicrobianos. Outro estudo avaliou o GenoType MTBDR em 143 amostras de escarro com microscopia positiva e este identificou corretamente a resistência à INH em 48 (84,2%) das 57 amostras contendo linhagens com alto nível de resistência à INH, e a resistência à RIF em 25 (96,2%) das 26 amostras contendo linhagens resistentes à RIF (SOMOSKOVI *et al.*, 2006). Um estudo mais recente avaliou o GenoType MTBDR*plus* na detecção da resistência à INH e RMP e comparou sua sensibilidade de detecção com o GenoType MTBDR. Em comparação aos testes convencionais de susceptibilidade aos antimicrobianos, ambos os ensaios identificaram corretamente a resistência à RMP em 74 das 75 linhagens (98,7%) e 30 das 31 amostras clínicas (96,8%). O GenoType MTBDR*plus*, comparado ao GenoType MTBDR, aumentou a taxa de detecção da resistência à INH de 66 (88%) para 69 (92%) entre as 75 linhagens resistentes à INH e de 36 (87,8%) para 37 (90,2%) entre as 41 amostras clínicas contendo linhagens resistentes à INH (HILLEMANN *et al.*, 2007).

Reverse-Line Blot Hybridization Assay (RIFO assay) e *PLH-Rifoligotyping* são metodologias *in house* e semelhantes ao INNO-LiPA, do qual também detectam a resistência da micobactéria à RMP associada com mutações no gene *rpoB* de *M. tuberculosis*. Ambas utilizam sondas e hibridização reversa. A diferença entre essas metodologias e o teste INNO-LiPA é o tipo de membrana e a visualização dos resultados. Neste teste os resultados são visualizados em um filme de raio-X. Estas metodologias são rápidas e fornecem resultado em 24 horas, porém os reagentes são caros e tóxicos e exige um ambiente apropriado para revelação do filme (KREMER *et al.*, 1997; MORCILO *et al.*, 2002).

Os métodos moleculares representam um importante papel não somente em detectar a resistência, mas também no monitoramento da terapia. As vantagens oferecidas por esses métodos são bastante promissoras, porém deve-se ter claro que as bases genéticas da resistência ainda não estão esclarecidas na sua totalidade para todos os fármacos usados no tratamento da TB. Isto significa que a detecção de uma mutação associada com a resistência é clinicamente relevante, mas a ausência de mutação nos genes alvos não significa necessariamente que o microrganismo em questão seja sensível (ROSSETTI *et*

al., 2002). Como ainda não se conhece totalmente a base genética da resistência, apesar das vantagens que os métodos moleculares oferecem, eles ainda necessitam ser confirmados pelos métodos fenotípicos convencionais (HILLEMANN *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O surgimento de linhagens resistentes tem contribuído significativamente para o aumento da TB em nível mundial. Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos convencionais são muito demorados, o seqüenciamento de DNA, tem sido considerado muito laborioso para o uso rotineiro, além de ter o custo elevado. Métodos comerciais moleculares, enquanto sensíveis e específicos, são demasiadamente onerosos para o uso na rotina principalmente em países onde a doença vem crescendo. Tendo presente que a rápida identificação das linhagens resistentes pode contribuir efetivamente no tratamento e controle da TB, este trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de um método molecular de hibridização reversa para detecção da mutação AGC → ACC no códon 315 do gene *katG* relacionada com a resistência à INH em isolados de *M. tuberculosis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Padronização da técnica de PCR duplex para o gene *katG* juntamente com o elemento de inserção IS6110;
- ✓ Desenvolvimento de um protocolo de hibridização e de um sistema de detecção colorimétrico;
- ✓ Padronização do método desenvolvido com DNAs provenientes de cultura de *M. tuberculosis*;
- ✓ Comparação dos resultados obtidos com o seqüenciamento do gene *katG*;
- ✓ Comparação de alguns resultados obtidos com o teste padronizado com o método comercial GenoType MTBDR*plus*;
- ✓ Avaliação da sensibilidade e a especificidade da técnica desenvolvida;

- ✓ Avaliação da acurácia da técnica padronizada para detecção da mutação AGC → ACC no códon 315 do gene *katG* diretamente de amostra clínica.

3. MANUSCRITO

Development of a colorimetric reverse hybridization assay for detection of the mutation most frequently associated with resistance to isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*

(manuscrito submetido para revista *Journal of Microbiological Methods*)

Development of a colorimetric reverse hybridization assay for detection of the mutation most frequently associated with resistance to isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*

Mirela Verza^{1,2}, Raquel de A. Maschmann^{1,2}, Márcia S. N. Silva^{1,3}, Elis R. Dalla Costa^{1,4},
Marta O. Ribeiro¹, Philip Noel Suffys⁵, Enrico Tortoli⁶, Fiorella Marcelli⁶, Arnaldo Zaha²,
Maria Lúcia R. Rossetti^{1,3*}

¹Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brazil

³Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brazil

⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brazil

⁵Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

⁶Centro Regionale di Riferimento per i Micobatteri, Ospedale di Careggi, Italy

*Corresponding author: Maria Lúcia R. Rossetti, Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, CDCT/FEPPS; Av. Ipiranga 5400, CEP 90610-000 - Porto Alegre, RS, Brazil. Phone/Fax: 55 51 33520336
Email: mrossett@terra.com.br

* Submetido em 04/07/2008

Abstract

Mutations in *katG*, *ahpC* and *inhA* genes were identified and have been correlated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates, mutation in *katG* S315T being the most frequent. Rapid detection of this mutation could therefore improve the choice of an adequate anti-TB regimen, epidemiological monitoring of isoniazid resistance and, possibly to track transmission of resistant strains. Reverse Hybridization Assay (RHA) was used for the rapid identification of *katG*315 mutation in *M. tuberculosis*. One hundred eighty *M. tuberculosis* isolates and 46 clinical specimens were tested for the detection of isoniazid-resistant *katG*315 mutants. When the test was applied to the DNA from cultured *M. tuberculosis* it was possible to successfully detect the most common mutation at *katG*315 (AGC→ACC) in all isolates studied in comparison with DNA sequencing. For clinical samples, the RHA presented agreement with the sequencing in all samples with smear positive. The test is cheaper than commercial tests, efficient, and therefore a promising alternative for the rapid identification of isoniazid resistance in regions with a high prevalence of *katG*315 mutants.

Keywords: Isoniazid · *katG*315 · Resistance · Reverse Hybridization Assay · Tuberculosis

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is the only infectious disease that has been considered as a global emergency by the World Health Organization with one third of the world's population latently infected with *Mycobacterium tuberculosis* (World Health Organization, 2008). The emergence and spread of multidrug-resistant (MDR) strains of *M. tuberculosis* are serious threats to the control of TB and comprise an increasing public health problem. Patients infected with MDR strains, resistant at least to rifampicin (RIF) and isoniazid (INH), are difficult to cure and are more likely to remain as sources of infection for a longer period than patients with drug-susceptible strains (Zumia and Grange, 2001). The recently observed spreading of extensively drug-resistant TB (XDR-TB), defined as MDR-TB with additional resistance to a fluoroquinolone and a second-line injectable drugs, is often observed to be incurable (World Health Organization, 2008).

Early diagnosis of the disease by rapid identification of resistant strains are essential for efficient treatment and control of the MDR strains. Faster application of effective chemotherapy also prevents further spread of drug-resistant isolates (Parsons et al., 2004).

INH is one of the most effective and specific antibiotic available for the treatment of TB and it is also widely used to treat latent *M. tuberculosis* infections (Espinal et al., 2001). This antibiotic is a prodrug that requires activation by the catalase-peroxidase enzyme, encoded by the *katG* gene (Hazbon et al., 2006). Activated drug appears to disrupt the synthesis of essential cell wall mycolic acids (Rawat et al., 2003). Resistance to INH is achieved mainly through mutations in the *katG* gene and in the *inhA* promoter region for the majority of isolates while mutations in other genes, such as *ahpC* and *ndh*, have been implicated in isoniazid resistance, but their roles are not yet proven (Hazbon et al., 2006).

In different studies the frequency of INH-resistant strains containing mutation in codon 315 of the *katG* gene ranged from 50 to 100% (Hillemann et al., 2005; Musser et al., 1996; Silva et al., 2003; van Doorn et al., 2006; van Soolingen et al., 2000; Zhang et al., 2005). In most cases, one amino acid substitution at codon 315 (AGC→ACC/Ser→Thr) is reported to be the most frequent (Abate et al., 2001; Mdluli et al., 1996, Mokrousov et al., 2002; Musser et al., 1996; Silva et al., 2003; van Doorn et al., 2001; van Soolingen et al., 2000; Zakerbostanabad et al., 2008). Mutations in *katG*315 may be favored because mutations at this location appear to decrease INH activation without abolishing catalase-peroxidase activity, a potential virulence factor (Kapetanaki et al., 2005; Pym et al., 2002; Saint-Joanis et al., 1999; Wei et al., 2003). The *katG*315 mutation is associated with the development and transmission of MDR-TB, whereas other isoniazid resistance-conferring mutations, such as *inhA* -15C→T, are not (Hazbon et al., 2006; van Doorn et al., 2006; van Soolingen et al., 2000).

Drug susceptibility testing by conventional methods takes several weeks while generally, DNA sequencing-based approaches are considered the reference assays for the detection of mutations, but often, they have been found to be too cumbersome for routine use. Commercial molecular hybridization tests for detection of resistance to INH, such as GenoType MTBDR*plus* (Hain Lifescience, Nehren, Germany), although sensitive and specific, is too costly for routine use where the burden of disease is greatest (Makinen et al., 2006).

We therefore developed a molecular assay based on reverse hybridization (RHA) and colorimetric revelation for characterization of the *katG*315 and evaluated its application using DNA from culture and clinical samples of *M. tuberculosis*. The results of

this procedure were compared to data obtained by DNA sequencing and some of the DNAs were also analyzed by GenoType MTBDR*plus* commercial test.

2. Materials and Methods

2.1 M. tuberculosis DNA isolates

The RHA was performed with DNA of *M. tuberculosis* obtained from cultures of the FEPPS bacterial collection. The assay was standardized with a total of 180 DNAs: 60 DNAs with mutation at *katG*315 (58 with the mutation AGC→ACC and 2 with the mutation AGC→AAC), 119 without mutation in this codon and one isolate with the mix AGC/ACC (data defined previously by DNA sequencing). The *M. tuberculosis* reference strain H37Rv was used as a wild-type control. The results of 24 of these samples (15 isolates with the *katG*315 mutation, 8 isolates without mutation in this codon and one isolate with the mix AGC/ACC) were compared with the results of GenoType MTBDR*plus* commercial test (Hain Lifescience, Nehren, Germany).

After standardization with DNA from culture, the RHA was applied to 46 clinical specimens: 40 samples (all respiratory samples) collected for routine mycobacterial testing between November 2006 and September 2007 at the Laboratório Central do RS, Brazil. Six more samples (5 respiratory samples and 1 gastric lavage) were collected during routine in January 2008 at the Laboratorio di Microbiologia e Virologia of the Centro Regionale di Riferimento per i Micobatteri, Ospedale di Careggi, Florence, Italy. Samples were decontaminated as described by Kent and Kubica, (1985) and submitted to bacterioscopy for determination of the presence of acid-fast bacilli (AFB), culturing in Löwenstein-Jensen, tested for conventional antimicrobial susceptibility testing (AST) and sequenced for *katG* gene.

2.2 Extraction of nucleic acids

Nucleic acids were extracted from *M. tuberculosis* cultures using the CTAB method as described by van Soolingen et al., (1994) and from clinical samples using the method adapted from Boom et al., (1990).

2.3 Sequence analysis

A 232 bp fragment of *katG* was amplified using primers *katG1* (CAT GAA CGA CGT CGA AAC AG) and *katG2* (CGA GGA AAC TGT TGT CCC AT) as described by Silva et al., 2003. Amplifications were carried out in a thermocycler Mini-Cycler–Hot Bonnet PTC–150 (MJ Research) as follows: 94°C for 2 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 2 min for 30 cycles. Amplification products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gels. PCR products were purified with polyethylene glycol (PEG) method (<http://pubmlst.org/neisseria/mlst-info/nmeningitida/pcr.shtml>). Sequencing was performed using Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit and AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in the ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems). The sequences obtained were analyzed using programs PREGAP and GAP4 from the STADEN package 10.0. Only nucleotide sequences with a phred value higher than 20 were considered for analysis.

2.4 GenoType MTBDR plus assay

A selection of samples was submitted to *GenoType MTBDRplus*, a commercially available reverse hybridization based assay for determination of mutations associated with susceptibility or resistance to RIF and INH. Experimental conditions were according to manufacturer's instructions.

2.5 Reverse Hybridization Assay

2.5.1 PCR primers and hybridization probes

Primers katG1 and katG2 (biotinylated) were used to generate a 232 bp fragment of *katG*. A 245 bp fragment of the insertion element IS6110 (used to confirm the presence of *M. tuberculosis* complex) was amplified using biotinylated primers IS1 (BIO-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC) and IS2 (BIO-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA), as described by Hermans et al., (1990).

The oligonucleotide probes were designed using the Primer Express Software v2.0 (Applied Biosystems), and included a wild-type probe (1W) (AMN-TCACCAGCGGCATC GAG), a mutated probe (2M) (AMN-TCACCACCGGCATCGAG) for detection of the *katG*315 mutation ACC. The probe for IS6110 (IS) (AMN-TTTTTTTTTTGGCCGTCCCGCCGA TCTC) was designed complementary to an internal sequence of insertion element IS6110. These probes were manufactured by Invitrogen with the 5'-terminal amino group.

2.5.2 Amplification conditions

The *katG* and IS6110 fragments were generated in a single PCR reaction in 50 µL containing 200 µM of each dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 25 pmol of each primers katG1 and katG2, 10 pmol of primers IS1 and IS2, 2.5 units of Taq DNA Polymerase (Cenbiot/UFRGS, Brazil) and 100 ng of genomic DNA (from culture). The amplification reactions were carried out in a Mini-Cycler-Hot Bonnet PTC-150 thermocycler (MJ Research) by submitting to: 95°C for 3 min, 35 cycles of 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, 72°C for 1.5 min and 72°C for 4 min. Each experiment included a negative (water instead of template DNA) and a positive control (100 ng of *M. tuberculosis* H37Rv DNA). For amplification of clinical samples, 10 µL of the processed material was submitted to the same conditions as above but using 40 instead of 35 thermal cycles. The PCR products were analyzed by electrophoresis in a 10% polyacrylamide gel.

2.5.3 Immobilization of probes on the membrane

The confection of RHA membranes was slightly modified from the procedure described by Kremer et al., (1997). Briefly, circles were drawn on a nylon membrane (Biodyne C, Pall Corporation) using an adapted support of propylene and cut in pieces of 1.5 cm X 2 cm, each containing four circles. The membrane pieces were then incubated in a cold solution of 16% EDAC (Acros Organics) for 15 min at room temperature and were washed in distilled water for 2 min at room temperature. After this, 10 μL of 5'-aminated oligonucleotide probe 1W (0.02 pmol/ μL), 2M (0.1 pmol/ μL) and IS (1.15 pmol/ μL) in 0.5 M NaHCO_3 (pH 8.4) were spotted separately in each circle and incubated for 1 min at room temperature. In addition, 10 μL of a conjugated control composed of 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of conjugated streptavidin-alkaline phosphatase (Invitrogen) was spotted in the fourth circle. Membranes were then incubated in 0.1 M NaOH for 10 min at room temperature and rinsed respectively with distilled water for 2 min at room temperature, 2X SSC/0,1% SDS for 10 min at 50°C and 20mM EDTA (pH 8.0) for 15 min at room temperature. Membranes were then sealed and stored at 4°C until further use.

2.5.4 Hybridization and colorimetric detection of biotinylated PCR products

Before hybridization, membranes were rinsed with 2X SSC/0.1%SDS for 5 min at 50°C and blocked by incubating in 2X SSC with 3% bovine serum albumin (BSA, INLAB) at 50°C for 15 min. Twenty microlitres of biotinylated PCR products were diluted in a 150 μL of 2X SSC/0,1% SDS, denatured at 100°C for 10 min, transferred to 4°C and incubated with the membranes in 2X SSC/0.1% SDS at 62°C for 45 min. After hybridization, excess PCR products was removed, membranes washed consecutively twice with 2X SSC/0.5% SDS and 0.2X SSC/0.5% SDS at 57°C for 10 min, incubated in TSB buffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) containing 6% BSA for 30 min at 50°C

and TBS for 5 min at room temperature. Membranes were then incubated in TSB with 0.33 µg/mL streptavidin-alkaline phosphatase conjugate for 15 min at room temperature and excess conjugate removed by washing in TSB for 10 min at room temperature and with TSA buffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 5 mM MgCl₂·6H₂O, pH 9.5) for 10 min at room temperature. Visualization of hybridized amplicons was achieved through incubation with TSA buffer containing 40 µg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate and 82.5 µg/mL nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT, Sigma) during 10 min at room temperature and the colorimetric revelation reaction was stopped with distilled water. The membranes were then dried at room temperature and photographed. Intensity of hybridization signals obtained with assay samples was compared with those obtained in the circles containing positive and negative PCR controls.

2.6 Sensitivity and specificity tests

The sensitivity of the RHA was determined by performing the procedure described above using PCR products obtained with a serial dilution of *M. tuberculosis* H37Rv DNA (1 pg to 100 ng). The specificity of the procedure was determined by performing the described PCR and hybridization procedure using 100 ng DNA extracted from *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus pneumoniae*, *Salmonella enterica* and *Haemophilus influenzae* obtained from Laboratório Central do RS, Brazil.

2.7 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS 12.0 statistical program (SPSS Ins. Chicago, IL, USA). Agreement between the DNA sequencing and RHA techniques was evaluated using *kappa* score in both the DNA from culture and clinical specimens with smear positive of *M. tuberculosis*.

3. Results

The RHA was standardized with DNA from culture and applied for the detection of *katG315* mutation in clinical samples of *M. tuberculosis*. For this purpose, amplification products with the expected sizes of 245 pb (*IS6110*) and 232 pb (*katG*) were hybridized to the membrane.

All 58 samples with the mutation ACC at *katG315* hybridized correctly with the mutated probe (2M). The positive result was visualized by a purple precipitate on the membrane's spot. The spot of wild-type probe (1W) appeared clear while the spot of *IS6110* probe (IS) and the spot of control of conjugate were visualized as purple precipitates (Fig. 1.A). Two samples with mutation AAC at *katG315* did not hybridize with wild-type and mutated probes, but hybridized with the IS probe and reacted with the conjugate control (Fig. 1.B). All 119 samples without mutation at *katG315* hybridized correctly with the 1W probe. The spot of 2M appeared clear while the spot of IS and the spot of control of conjugate were visualized as purple precipitates (Fig. 1.C). The same results were obtained with the reference strain H37Rv (data not shown). One sample containing both wild-type and mutated DNA sequences (AGC/ACC) at *katG315* hybridized with the 1W and 2M probes (data not shown). The negative control of PCR did not hybridize with 1W, 2M and IS probes. Complete concordance was found with sequencing results.

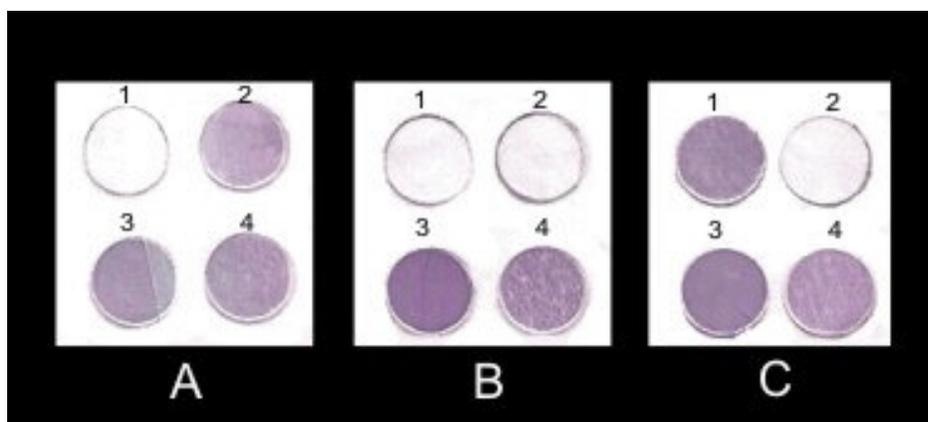


Fig 1. Representative results of the Reverse Hybridization Assay

(A) Hybridization of the PCR products from samples with the mutation ACC at *katG315* to the probes (B) Hybridization of the PCR products from samples with mutation AAC at *katG315* to the probes (C) Hybridization of the PCR products from samples without mutation at *katG315* to the probes. (1) wild-type probe (1W), (2) mutated probe (2M), (3) IS6110 probe (IS), (4) conjugate control (CC).

The RHA results of 24 of these samples which had complete concordance with the sequencing results were compared with the results of GenoType MTBDR*plus*. This assay could not identify 4 of 24 samples: 3 of them (with ACC mutation) did not hybridize with the mutated probe, and reacted just with the conjugate control and 1 sample hybridized only with the wild-type probe while the sample contain a mix of wild-type and mutated DNA sequences (AGC/ACC) at *katG315*. The results of RHA for clinical samples and the comparison with DNA sequencing and AST are shown in Table 1.

Table 1

RHA results for clinical samples and their comparison with DNA sequencing and AST

| CS (n=46) | AFB | Culture | AST | <i>katG</i> 315 Sequencing | RHA |
|-----------|-----|---------|---------|----------------------------|---------|
| 25 | neg | neg | nd | nd | not hyb |
| 3 | neg | 1 col | nd | - | not hyb |
| 1 | neg | 18 col | nd | AGC | not hyb |
| 1 | + | neg | nd | AGC | hyb AGC |
| 1 | + | pos | INH (S) | ACC | hyb ACC |
| 3 | ++ | pos | INH (R) | ACC | hyb ACC |
| 1 | ++ | pos | INH (R) | AGC | hyb AGC |
| 5 | ++ | pos | INH (S) | AGC | hyb AGC |
| 1 | +++ | pos | INH (R) | ACC | hyb ACC |
| 1 | +++ | pos | INH (R) | AGC | hyb AGC |
| 4 | +++ | pos | INH (S) | AGC | hyb AGC |

CS = clinical sample, AFB = Acid-Fast Bacilli, AST = Antimicrobial Susceptibility Testing (only done with more than 20 colonies on the culture) (Barrera and Malbran, 2008), RHA = Reverse Hybridization Assay, INH (S) = isoniazid-sensitive *M. tuberculosis*, INH (R) = isoniazid-resistant *M. tuberculosis*, (+) = 10 to 99 AFB per 100 fields, (++) = 1 to 10 AFB per field in 50 fields, (+++) = More than 10 AFB per field in 20 fields (<http://wwwn.cdc.gov/dls/ila/documents/lstc2.pdf>), neg = negative, pos = positive, col = colony, nd = not done, (-) = not detected, not hyb = not hybridized, hyb = hybridized.

The limit of detection for *katG* and IS in a membrane was 10 pg DNA of H37Rv. The PCR product from *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus pneumoniae*, *Salmonella enterica* and *Haemophilus influenzae* did not hybridize with 1W, 2M and IS probes.

The value of the *kappa* obtained was 1.00 for both the DNA from culture and clinical specimens of *M. tuberculosis*.

4. Discussion

The early identification of drug resistance would help not only to optimize the treatment of MDR-TB, but also to break chains of transmission, to identify any hot-spot region in the country for proper implementation of the TB control programs (Suresh et al., 2007), and contribute for the reduction of total treatment cost (Jiao et al., 2007).

Mutations in *katG315* are associated with higher minimum inhibitory concentration for isoniazid than mutations in the *inhA* promoter region and therefore are probably of greater clinical significance (Ramaswamy et al., 2003; van Doorn et al., 2006; van Soolingen et al., 2000). This mutation is associated with viable and virulent pathogens (Heym and Cole, 1992; Mdluli et al., 1998). A possible relationship between the mutation *katG315* and transmissibility was suggested in previous reports, where patients yielding strains with this mutation were associated with an increased transmission risk (or an increased progression from infection to disease) (van Doorn et al., 2006; van Soolingen et al., 2000). Part of the success of the *katG315* mutation is probably caused by the fact that catalase peroxidase is still active in these mutants (van Doorn et al., 2006).

These observations indicate that the *katG315* mutation is an interesting target for diagnostics and further research. All these aspects firmly justify our focus on this mutation and minimize the need to search for others mutations that encode resistance to INH.

The results obtained in this study using RHA were very satisfactory. The test could successfully detect the most common mutation in *katG315* (AGC→ACC) in all strains studied as compared with DNA sequencing which is a gold standard reference. The assay

showed high sensitivity detecting a small amount of DNA (10 pg) of H37Rv and the specificity was 100% in comparison with *M. tuberculosis* from culture. When compared with GenoType MTBDR*plus*, the RHA showed high accuracy, detecting a mix of wild-type and mutated DNA sequences (AGC/ACC) at *katG315* while GenoType MTBDR*plus* detected only wild-type sequence (AGC). The GenoType MTBDR*plus* did not hybridize with the mutated probe and also with the amplification control in 3 samples, probably because of a small amount of DNA.

The method developed could also detect the *katG315* mutation of *M. tuberculosis* in clinical specimens. The RHA data were concordant with the results of the sequencing for all but one sample (broncho-alveolar lavage) with negative AFB the test could not identify the sequence, probably due to the stage of the mycobacterial disease and the number of mycobacteria present in the sample (18 colonies on the culture). This worked well in 3 samples with negative AFB and one colony on the culture, where the sequence could not be determined. However, commercial tests like GenoType MTBDR*plus* recommend to analyze only samples with AFB+ (http://www.hainlifescience.com/pdf/304xx_pbl.pdf). In one clinical sample with AFB+ and negative culture, the result found in both the *katG315* sequencing and RHA were a wild-type sequence. In another clinical sample we found the mutation ACC at *katG315* with RHA according to result of the DNA sequencing, but this sample was INH-susceptible in the AST. Therefore, it is possible that the phenotypic test had a poor performance and many isolates with a low level of INH resistance was considered as susceptible to INH (Wu et al., 2006). In two clinical samples we found the wild-type sequence with our assay and DNA sequencing, but INH resistance in AST. These results could be explained by the INH resistance mutations being located elsewhere than codon 315.

The RHA could be an accurate and sensitive tool for the rapid identification of INH-resistant *M. tuberculosis* associated with *katG315* mutation. The test requires simple equipment, is inexpensive, the results are generally easily interpretable and does not require viable organisms reducing the biohazard risk in the laboratory. The method is rapid mainly when used directly on smear-positive specimens (two workdays). However, this strategy may not be able to detect very low number of bacillus in clinical samples. The test can also reveal the presence of additional mutations besides ACC at *katG315* by negative hybridization result with wild-type probe.

This kind of test may be particularly important for some geographical locations/ethnic groups where the mutation ACC at *katG315* gene occur more frequently, and in locations with low prevalence of these mutations, will also help, by adjusting treatment regimens, in controlling the emergence of MDR-TB strains as they are more likely to acquire additional resistance (van Soolingen et al., 2000). In addition, resistance surveillance gives a good measure of the efficacy of regional control programmes and molecular epidemiological studies based on the dot-blot method could determine the frequency of specific mutations in a geographical area and monitor the spread of a cluster of drug resistant strains within a community or institution (Victor et al., 1999).

References

Abate, G., Hoffner, S.E., Thomsen, V.O., Miorner, H., 2001. Characterization of isoniazid-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of phenotypic properties and mutations in *katG*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 20, 329-333.

- Barrera, L., Malbran, C.G., 2008. Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica. Parte II - Cultivo. Organización Panamericana de la Salud.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol. 28,495-503.
- Espinal, M.A., Laszlo, A., Simonsen, L., Boulahbal, F., Kim, S.J., Reniero, A., Hoffner, S., Rieder, H.L., Binkin, N., Dye, C., Williams, R., Raviglione, M.C., 2001. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. N Engl J Med. 344, 1294–1303.
- Hazbon, M.H., Brimacombe, M., Bobadilla del Valle, M., Cavatore, M., Guerrero, M.I., Varma-Basil, M., Billman-Jacobe, H., Lavender, C., Fyfe, J., Garcia-Garcia, L., Leon, C.I., Bose, M., Chaves, F., Murray, M., Eisenach, K.D., Sifuentes-Osornio, J., Cave, M.D., Ponce de Leon, A., Alland, D., 2006. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 50, 2640-2649.
- Hermans, P.W. M., Soolingen, D.V., Dale J. W. Schuitema, A.R.J., Mcadam, R.A., Catty, D. Van Embden, J.D.A., 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol. 28, 2051-2058.
- Heym, B., Cole, S.T., 1992. Isolation and characterization of isoniazid-resistant mutants of *Mycobacterium smegmatis* and *M. aurum*. Res Microbiol. 143, 721-730.
- Hillemann, D., Kubica, T., Agzamova, R., Venera, B., Rusch-Gerdes, S., Niemann, S., 2005. Rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Kazakhstan. Int J Tuberc Lung Dis. 9, 1161-1167.

- Jiao, W.W., Mokrousov, I., Sun, G.Z., Li, M., Liu, J.W., Narvskaya, O., Shen, A.D., 2007. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China. *Chin Med J (Engl)*. 120, 814-819.
- Kapetanaki, S.M., Chouchane, S., Yu, S., Zhao, X., Magliozzo, R.S., Schelvis, J.P., 2005. *Mycobacterium tuberculosis* KatG (S315T) catalase-peroxidase retains all active site properties for proper catalytic function. *Biochemistry*. 44, 243-252.
- Kent, P.T., Kubica, G.P., 1985. *Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory*. Atlanta, GA: Centers for Diseases Control.
- Kremer, K., van Soolingen, D., van Zetten, M., 1997. PCR + Reverse line blot hybridization (PLH) to detect rifampicin resistance. *Laboratory manual*. National Institute of Public Health and Environment. Bilthoven.
- Makinen, J., Marttila, H.J., Marjamaki, M., Viljanen, M.K., Soini, H., 2006. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 44, 350-352.
- Mdluli, K., Sherman, D.R., Hickey, M.J., 1996. Biochemical and genetic data suggest that *inhA* is not the primary target for activated isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 174, 1085–1090.
- Mdluli, K., Slayden, R.A., Zhu, Y., Ramaswamy, S., Pan, X., Mead, D., Crane, D.D., Musser, J.M., Barry III, C.E., 1998. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science*. 280, 1607–1610.
- Mokrousov, I., Narvskaya, O., Otten, T., Limeschenko, E., Steklova, L., Vyshnevskiy, B., 2002. High prevalence of *KatG* Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother*. 46, 1417-1424.

- Musser, J.M., Kapur, V., Williams, D.L., Kreiswirth, B.N., van Soolingen, D., van Embden, J.D., 1996. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J Infect Dis.* 173, 196-202.
- Parsons, L.M., Somoskovi, A., Urbanczik, R., Salfinger, M., 2004. Laboratory diagnostic aspects of drug resistant tuberculosis. *Front. Biosci.* 9, 2086–2105.
- Pym, A.S., Saint-Joanis, B., Cole, S.T., 2002. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun.* 70, 4955-4960.
- Ramaswamy, S.V., Reich, R., Dou, S.J., Jasperse, L., Pan, X., Wanger, A., Quitugua, T., Graviss, E.A., 2003. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 1241-1250.
- Rawat, R., Whitty, A., Tonge, P.J., 2003. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of *InhA*, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 13881-13886.
- Saint-Joanis, B., Souchon, H., Wilming, M., Johnsson, K., Alzari, P.M., Cole, S.T., 1999. Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/peroxidase, *KatG*, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J.* 338 (Pt 3), 753-760.
- Silva, M.S., Senna, S.G., Ribeiro, M.O., Valim, A.R., Telles, M.A., Kritski, A., Morlock, G.P., Cooksey, R.C., Zaha, A., Rossetti, M.L., 2003. Mutations in *katG*, *inhA*, and

- ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*.
J Clin Microbiol. 41, 4471-4474.
- Suresh, N., Singh, U.B., Gupta C., Arora, J., Rana, T., Samantaray, J.C., 2007. Rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly from stained sputum smears using single-tube nested polymerase chain reaction deoxyribonucleic acid sequencing. Diagn Microbiol Infect Dis. 58, 217-22.
- van Doorn, H.R., De Haas, P.E., Kremer, K., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Borgdorff, M.W., van Soolingen, D., 2006. Public health impact of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a mutation at amino-acid position 315 of *katG*: a decade of experience in The Netherlands. Clin Microbiol Infect. 12, 769-775.
- van Doorn, H.R., Kuijper, E.J., van der Ende, A., Welten, A.G., van Soolingen, D., de Haas, P.E., Dankert, J., 2001. The susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and the Arg-->Leu mutation at codon 463 of *katG* are not associated. J Clin Microbiol. 39, 1591-1594.
- van Soolingen, D., De Hass, P.E., Hermans, P.W.M., Van Embden, J.D.A., 1994. DNA Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. Methods Enzymol. 235, 196-204.
- van Soolingen, D., De Haas, P.E., van Doorn, H.R., Kuijper, E., Rinder, H., Borgdorff, M.W., 2000. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. J Infect Dis. 182, 1788-1790.
- Victor, T.C., Jordaan, A.M., van Rie, A., van der Spuy, G.D., Richardson, M., van Helden, P.D., Warren, R., 1999. Detection of mutations in drug resistance genes of

- Mycobacterium tuberculosis* by a dot-blot hybridization strategy. *Tuber Lung Dis.* 79, 343-348.
- Wei, C.J., Lei, B., Musser, J.M., Tu, S.C., 2003. Isoniazid activation defects in recombinant *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (*KatG*) mutants evident in *InhA* inhibitor production. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 670-675.
- World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO Report 2008.
- Wu, X.Q., Lu, Y., Zhang, J.X., Liang, J.Q., Li, H.M., Zhang, G.Y., Lu, C.H., Ding, B.C., 2006. Detection of the mutations in *katG* 315 and *inhA* -15 of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Chinese patients. *Chin Med J (Engl).* 119, 230-233.
- Zakerbostanabad, S., Titov, L.P., Bahrmand, A.R., 2008. Frequency and molecular characterization of isoniazid resistance in *katG* region of MDR isolates from tuberculosis patients in southern endemic border of Iran. *Infect Genet Evol.* 8, 15-19.
- Zhang, M., Yue, J., Yang, Y.P., Zhang, H.M., Lei, J.Q., Jin, R.L., Zhang, X.L., Wang, H.H., 2005. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol.* 43, 5477-5482.
- Zumia, A., Grange, J.M., 2001. Multidrug-resistant tuberculosis - can the tide be turned? *Lancet Infect Dis.* 1, 199-202.

4. DISCUSSÃO

A TB continua a causar grande mortalidade e sofrimento principalmente em países subdesenvolvidos. Além da AIDS, a TB-MDR e a recentemente descrita TB-XDR complicam severamente o tratamento e o controle da TB no mundo (DORMAN & CHAISSON, 2007; SHAH *et al.*, 2007).

A identificação precoce da TB-MDR é crucial para a rápida administração de regimes terapêuticos adequados. Essa detecção rápida da resistência pode contribuir não só para otimizar o tratamento da TB-MDR, mas também para interromper as cadeias de transmissão, com o intuito de identificar regiões *hot-spot* de um país para a correta implementação dos programas de controle contra a TB (SURESH *et al.*, 2007). Além disso, poder contribuir para a redução do custo total do tratamento (JIAO *et al.*, 2007).

Como já mencionado, as mutações no *katG315* estão associadas com uma maior CMI para INH que mutações na região promotora do gene *inhA* e, portanto, são provavelmente de maior significância clínica (VAN SOOLIGEN *et al.*, 2000; RAMASWAMY *et al.*, 2003; VAN DOORN *et al.*, 2006). Esta mutação também está associada a patógenos viáveis e virulentos (HEYM & COLE, 1992; MDLULI *et al.*, 1998). Em estudos anteriores, pacientes portadores de linhagens com esta mutação foram associados com um maior risco de transmissão, ou uma maior progressão da infecção para doença (VAN SOOLIGEN *et al.*, 2000; VAN DOORN *et al.*, 2006).

O tipo de mutação que causa resistência a um fármaco pode influenciar na probabilidade de desenvolvimento de resistência a outros fármacos. Mutações no gene *katG* proporcionam um ambiente mais favorável para o desenvolvimento de resistência ao EMB do que mutações em outros genes. A comparação entre linhagens de *M. tuberculosis* monoresistentes à INH e MDR mostrou que nesta última ocorreu uma maior frequência de mutações no *katG315* (PIATEK *et al.*, 2000; BAKONYTE *et al.*, 2003; HILLEMANN *et al.*; 2005).

A identificação da resistência à INH na ausência da resistência à RMP é importante onde a resistência primária à INH e SM é alta. A resistência concomitante a estes dois fármacos, sem MDR, tem sido fortemente associada a

um aumento do risco de falência do esquema de tratamento padrão da OMS. A resistência primária à INH tem sido associada com o desenvolvimento de TB-MDR após o tratamento (QUY *et al.*, 2003).

Parte do sucesso da mutação no *katG315* é provavelmente causado pelo fato da catalase peroxidase ainda estar ativa nestes mutantes; 30-40% da atividade inicial da catalase permanece quando essa mutação é introduzida ao *katG*. A combinação da atividade residual da catalase e a resistência à INH poderiam explicar o sucesso dos isolados com esta mutação (VAN DOORN *et al.*, 2006). Assim, a prevalência da mutação *katG315* demonstra a sua importância no desenvolvimento da resistência à INH em *M. tuberculosis*. Estas observações indicam que esta mutação é um interessante alvo tanto para o diagnóstico quanto para outras investigações. Todos estes aspectos, justificam de forma significativa, o foco deste estudo sobre esta mutação como uma forma alternativa de caracterizar a resistência à INH.

O Ensaio de Hibridização Reversa (EHR) desenvolvido pôde detectar com sucesso a mutação mais comum no *katG315* (AGC → ACC) em todas as linhagens estudadas em comparação com o seqüenciamento de DNA que é considerado padrão ouro. O teste mostrou uma alta sensibilidade analítica detectando uma pequena quantidade de DNA (10 pg) de H37Rv e a especificidade foi de 100% em comparação com a cultura de *M. tuberculosis*. Quando os resultados foram comparados com os resultados obtidos pelo teste GenoType MTBDR*plus*, o EHR apresentou alta acurácia, detectando uma mistura de seqüências de DNA selvagem e mutada (AGC/ACC) no gene *katG315*, enquanto o GenoType MTBDR*plus* detectou apenas a seqüência selvagem (AGC). Nesta linhagem, a presença da seqüência do tipo selvagem e mutada foi confirmada através do seqüenciamento. Estudos anteriores mostraram heterorresistência simultânea, que é a ocorrência simultânea de organismos sensíveis e resistentes aos fármacos na mesma amostra (RINDER *et al.*, 2001). Em três amostras não foi detectada a hibridização com a sonda mutada e também com o controle de amplificação, provavelmente devido a uma pequena quantidade de DNA.

O método desenvolvido também pôde detectar a mutação *katG315* de *M. tuberculosis* em DNA extraído de amostras clínicas. Os resultados do EHR foram comparados com o seqüenciamento de DNA e com o TSA (Tabela 1-manuscrito). Os dados do EHR foram concordantes com os resultados do seqüenciamento para todas as amostras com baciloscopia positiva. Em uma amostra (lavado broncoalveolar) com baciloscopia negativa, o teste não pôde identificar a seqüência, provavelmente devido ao estágio da doença micobacteriana e do número de micobactérias presentes na amostra (18 colônias na cultura). Isso também foi observado em três amostras com baciloscopia negativa e com uma colônia de crescimento na cultura, onde a seqüência não pôde ser determinada. No entanto, testes comerciais como o GenoType MTBDR*plus* recomendam somente a análise de amostras com baciloscopia positiva (http://www.hainlifescience.com/pdf/304xx_pbl.pdf). Em uma amostra clínica com baciloscopia considerada uma cruz (10 a 99 bacilos por 100 campos) e cultura negativa, o resultado encontrado no seqüenciamento do gene *katG315* e no EHR foram uma seqüência do tipo selvagem, sendo que o fato da cultura apresentar um resultado negativo seja, provavelmente, porque o bacilo estava inviável pelo tratamento antimicrobiano já iniciado. Em uma amostra clínica foi encontrado a mutação ACC no *katG315* com o EHR estando esse resultado de acordo com os dados obtidos no seqüenciamento do DNA, porém esta amostra foi sensível à INH no TSA. Este resultado mostra a possibilidade do teste fenotípico ter apresentado uma baixa *performance* e muitos isolados com um baixo nível de resistência à INH são considerados sensíveis à ela (WU *et al.*, 2006). Em duas amostras clínicas, foi encontrado a seqüência selvagem com o EHR e seqüenciamento de DNA, mas resistência à INH no TSA. Estes resultados poderiam ser explicados pelas mutações que conferem resistência à INH estarem localizadas em outros genes e/ou ocorrer por indução de bombas de efluxo ou simplesmente devido a fatores ainda desconhecidos. O estudo realizado por DALLA COSTA (2008) demonstrou que 8% dos isolados de *M. tuberculosis* analisados apresentaram resistência à INH no TSA, porém nenhuma mutação foi encontrada nos genes *katG*, *ahpC* e *inhA*. Isso também foi observado em outro estudo, onde 12,5% dos isolados

dados como resistentes à INH não apresentaram mutações nestes mesmos genes (SILVA *et al.*, 2003).

O EHR pode ser uma ferramenta sensível e precisa para a identificação de *M. tuberculosis* resistente à INH associado a substituição *katG* Ser315Thr. O método é rápido, requer equipamentos simples, tem um custo acessível e os resultados são facilmente interpretados. Também, poderia este ser implementado como parte da rotina das práticas de laboratórios clínicos em áreas com alta prevalência de TB-MDR e onde os métodos automatizados, tais como seqüenciamento de DNA não estão facilmente disponíveis.

Este tipo de teste pode contribuir de forma significativa em algumas áreas geográficas ou grupos étnicos onde a mutação ACC no *katG*315 ocorre com maior freqüência. Além disso, a rápida detecção de linhagens com esta mutação pelo EHR, mesmo em localizações geográficas com baixa prevalência o teste também será importante no ajuste dos regimes de tratamento e no controle do aparecimento de linhagens TB-MDR (VAN SOOLIGEN *et al.*, 2000).

A vigilância da resistência é uma boa medida da eficácia dos programas de controle regionais e estudos epidemiológicos moleculares baseados no método dot-blot poderiam determinar a freqüência de mutações específicas em uma área geográfica e monitorar a propagação de linhagens resistentes em uma comunidade ou instituição (VICTOR *et al.*, 1999).

O diagnóstico rápido feito pelo teste desenvolvido justifica sua utilização no estabelecimento de regimes de tratamento preliminares até que os resultados dos métodos fenotípicos convencionais sejam confirmados. O teste não requer organismos viáveis e, portanto, reduz o risco biológico em laboratório.

Em conclusão, o presente estudo sugere que o *screening* de micobactérias para a presença da mutação no gene *katG*315 pode ser uma ferramenta útil, tanto para a orientação terapêutica individual de cada paciente como para a vigilância da resistência. O teste também pode indicar a presença de mutações adicionais além da ACC neste gene pelo resultado negativo da hibridização com a sonda tipo selvagem. Os resultados do presente estudo indicam que o teste apresenta um bom desempenho e sensibilidade para a rápida detecção da mutação *katG*315 (dois dias), quando usado diretamente em amostras clínicas com

baciloscopia positiva. No entanto, esta estratégia pode não ser capaz de detectar um número muito baixo de bacilos nas amostras clínicas.

Os testes moleculares de susceptibilidade aos fármacos devem ser sempre confirmados por métodos fenotípicos (VAN RIE *et al.*, 2001; MIOTTO *et al.*, 2006; HILLEMANN *et al.*, 2007). Embora testes moleculares genéticos não possam ainda substituir plenamente os testes convencionais de susceptibilidade fenotípica, testes moleculares comercializados para um número limitado de códons alvo pode ser uma boa alternativa para o *screening* de resistência medicamentosa (VAN RIE *et al.*, 2001).

5. PERSPECTIVAS

O presente estudo tem como perspectiva utilizar os conhecimentos adquiridos para o desenvolvimento de um kit diagnóstico de detecção rápida de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes aos principais fármacos utilizados no tratamento da TB. Dessa forma, além de outras sondas relacionadas com a resistência à isoniazida, a inclusão de novas sondas que contemplem genes relacionados com a resistência a outros fármacos anti-TB se faz necessário.

Tendo em vista que o crescimento do número de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos tem alertado sobre a necessidade de que melhores estratégias sejam desenvolvidas para a detecção rápida da resistência aos fármacos anti-TB, uma vez que os métodos tradicionais, além de laboriosos são demorados, este kit uma vez validado poderia auxiliar na definição da escolha do melhor tratamento, evitando gastos desnecessários aos sistemas de saúde pública, bem como prejuízos à saúde do paciente. Também é de relevância a obtenção de um perfil de resistência dos isolados circulantes, o que permitiria definir melhor aspectos epidemiológicos, como virulência e a prevalência de resistência primária e secundária, fundamentais para a avaliação da qualidade do tratamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARON, L.; SAADOUN, D. & CALATRONI, I. Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 388-98, 2004.

ABATE, G.; HOFFNER, S. E.; THOMSEN, V. O. & MIORNER, H. Characterization of isoniazid-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of phenotypic properties and mutations in *katG*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 20: 329-33, 2001.

AÍNSA, J. A.; MARTIN, C. & GICQUEL, B. Molecular approaches to tuberculosis. *Molecular Microbiology*, 42 (2): 561-570, 2001.

ALTAMIRANO, M.; MAROSTENMAKI, J.; WONG, A.; FITZGERALD, M.; BLACK, W.A. & Smith, J. A. Mutations in the catalase-peroxidase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Infectious Diseases*, 169: 1162-5, 1994.

ÄNGEBY, K. A. K.; KLINTZ, L., & HOFFNER, S. E. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2): 553-555, 2000.

ÄNGEBY, K. A.; WERNGREN, J.; TORO, J. C.; HEDSTROM, G.; PETRINI, B. & HOFFNER, S. E. Evaluation of the BacT/ALERT 3D system for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology and Infection*, 9: 1148-52, 2003.

ATS. AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. The official statement of the American Thoracic Society and the Centers of Disease Control and Prevention and the

Council of the Infectious Disease Society of America. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161: 1376-1395, 2000.

BAKONYTE, D.; BARANAUSKAITE, A.; CICENAITE, J.; SOSNOVSKAJA, A. & STAKENAS, P. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Lithuania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 2009-11, 2003.

BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A.; BALASUBRAMANIAN, V.; SUN UM, K.; WILSON, T.; COLLINS, D.; LISLE, G. & JACOBS JR, W. R. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 263: 227-230, 1994.

BARDOU, F.; RAYNAUD, C.; RAMOS, C.; LANEELLE, M. A. & LANEELLE, G. Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, 144 (Pt 9): 2539-2544, 1998.

BATES, J. H. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. *Clinics in Chest Medicine*, 1: 167-174, 1980.

BATES, J. H. & STEAD, W. W. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Medicine Clinics of North America*, 77: 1205-17, 1993.

BECK, R. W. A chronology of microbiology. Washington: ASM, 2000.

BLACK, J. G. *Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

BLANCHARD, J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annual Review of Biochemistry*, 65: 215-239, 1996.

BLOOM, B. R. & MURRAY C. J. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*, 257: 1055-1064, 1992.

BLOOM, B. R. Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. Washington: ASM, 1994.

BOSTANABAD, S. Z.; TITOV, L. P; BAHRMAND, A. & NOJOU MI, S. A. Detection of mutation in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from tuberculosis patients in Belarus. *Indian journal of medical microbiology*, 26(2):143-7, 2008.

BRAGA, J. U.; BARRETO, A. M. W. & HIJJAR, M. A. Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil 1995 – 1997, IERDTB. Parte III: principais resultados. *Boletim de Pneumologia Sanitária*, 11(1): 76-81, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro nacional de epidemiologia. Coordenação de pneumologia sanitária. Manual de normas para o controle da tuberculose. 4ª ed. Brasília: Fundação nacional de saúde, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação nacional de doenças sexualmente transmissíveis e AIDS: Tuberculose: diagnóstico laboratorial – baciloscopia. Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação nacional de saúde. Centro de referência prof. Hélio Fraga. Sociedade brasileira de pneumologia e fisiologia. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5ª ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SNPT, 2002a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual técnico para o controle da tuberculose: Cadernos de atenção básica - Rev. Ampl. 6ª ed. Brasília: 2002b.

BRENNAN, P. J. & DRAPPER, P. Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis* (chapter 19). In: BLOOM, B. R. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington: ASM, 1994.

BRENNAN, P. J. & NIKAIIDO, H. The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 29-63, 1995.

BRUCE, A.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J. *Biologia Molecular da Célula*. 3^a ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

CAMUS, J. C.; PRYOR, M. J.; MÉDIGUE, C. & STEWART T. C. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*, 148: 2967-2973, 2002.

CANETTI, G.; FROMAN, S.; GROSSET, J.; HAUDURROY, P.; LANGEROVÁ, M.; MAHLER, H. T.; MEISSNER, G.; MITCHISON, D. A., & SULA, L. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull WHO*, 29: 565-578, 1963.

CANETTI, G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. *American Review of Respiratory Disease*, 92(5): 687-703, 1965.

CANETTI, G.; FOX, W.; KHOMENKO, A.; MAHLER, H. T.; MENON, N. K.; MITCHISON, D. A.; RIST, N., & SMELEY, N. A. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull WHO*, 41: 21-43, 1969.

CARDOSO, R. F.; COOKSEY, R. C.; MORLOCK, G. P.; BARCO, P.; CECON, L.; FORESTIERO, F.; LEITE, C. Q.; SATO, D. N.; SHIKAMA MDE, L.; MAMIZUKA, E. M.; HIRATA, R. D. & HIRATA, M. H., Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 3373-3381, 2004.

CATALDI, A. & ROMANO, M. Tuberculosis caused by Other Members of the *M. tuberculosis* Complex (chapter 8). In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C. & RITACCO, V. *Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care*. 1^a ed. 2007.

CAVIEDES, L.; LEE, T. S.; GILMAN, R. H.; SCHEEN, P.; SPELLMAN, E.; LEE, E. H.; BERG, D. E. & MONTENEGRO-JAMES, S. M. The tuberculosis working group in Peru. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3): 1203-1208, 2000.

CHAN, J. & KAUFMANN, S. H. E. Immune mechanisms of protection (chapter 24). In: Bloom, B. R. (Ed.). *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington: ASM, 1994.

CHAUHAN, A.; MADIRAJU, M. V. & FOL, M. *Mycobacterium tuberculosis* cells growing in macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. *The Journal of Bacteriology*, 188: 1856-65, 2006.

CHOPRA, I. & BRENNAN, P. Molecular action of antimycobacterial agents. *Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 78: 89-98, 1998.

COCKERILL III, F. R.; UHL, J. R.; TEMESGEN, Z.; ZHANG, Y.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D.; WILLIAMS, D. L. & KLINE, B. C. Rapid Identification of a point mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (*katG*) gene associated with isoniazid resistance. *Journal of Infectious Diseases*, 171: 240-245, 1995.

COCKERILL III, F. R. Genetics methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 199-212, 1999.

COLE, S. T. & TELENTI A. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *European Respiratory Journal*, 20: 701s-713s, 1995.

COLE, S. T.; BROSCH, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHUCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HOMSBY, T.; JEGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; & BARREL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393: 537-544, 1998.

COLL, P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(6): 299-308, 2003.

CORBET, E. L.; WATT, C. J.; WALKER, N.; MAHER D.; WILLIAMS, B. G.; RAVIGLION, M. C. & DYE, C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Archives of Internal Medicine*, 163: 1009-1021, 2003.

DALCOLMO, M. P.; MELO, F. A. F.; AFIUNE, J. B.; IDE-NETO, J.; SEISCENTO, M.; NORONHA, A. M. L. & GERHARD-FILHO, G. Esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente. *Boletim de Pneumologia Sanitária*, 3(2): 26-34, 1995.

DALLA COSTA, E. R. Caracterização das mutações envolvidas na resistência à isoniazida em isolados de *Mycobacterium tuberculosis* do Brasil, Argentina e Peru. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100: 1862-70, 2006.

DANNENBERG, A. M. & ROOK, G. A. W. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses – dual mechanisms that control bacillary multiplication (chapter 27) *In*: BLOOM, B. R. (Ed.). Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington: ASM, 1994.

DEAN, M. *et al.* Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. *Cell*, 61: 863-870, 1990 apud COCKERILL III, F. R. Genetics methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 199-212, 1999.

DE ROSSI, E.; AINSA, J. A. & RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 36-52, 2006.

DORMAN, S. E. & CHAISSON, R. E. From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nature Medicine*, 13: 295-8, 2007.

ESPASA, M.; GONZALEZ-MARTIN, J. & ALCAIDE, F. Direct detection in clinical samples of multiple gene mutations causing resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin using fluorogenic probes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55: 860-5, 2005.

ESPINAL, M. A.; DYE, C.; RAVIGLIONE, M. C. & KOCHI, A. Rational “DOTS Plus” for the control of MDR-TB. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 3(7): 561-563, 1999.

ESPINAL, M. A.; LASERSON, K.; CAMACHO, M.; FUSCHENG, Z.; KIM, S. J.; TLALI, E.; SMITH, I.; SUAREZ, P.; ANTUNES, M. L.; GEORGE, A. G.; MARTIN-CASABONA, N.; SIMELANE, P.; WEYER, K.; BINKIN, N. & RAVIGLIONE, M.C.

Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 5(10): 887-893, 2001.

ESPINAL, M. A.; LASZLO, A.; SIMONSEN, L.; BOULAHBAL, F.; KIM, S. J.; RENIERO, A.; HOFFNER, S.; RIEDER, H. L.; BINKIN, N.; DYE, C.; WILLIAMS, R. & RAVIGLIONE, M. C. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *New England Journal of Medicine*, 344: 1294-1302, 2001.

FORTES, A. M. & DALCOLMO, M. P. Tuberculose multirresistente. *Pulmão RJ*, 6: 68-80, 1996.

FLUIT, A. D. C.; VISSER, M. R. & SCHIMTZ, F.J. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 836-871, 2001.

FUCHS, F. D. & WANNMACHER, L. Farmacologia Clínica: Fundamentos da terapêutica racional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

GABIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, A.; KÜHN, I.; MCKENZIE, D. & MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods*, 50(1): 63-73, 2002.

GANDHI, N.R.; MOLL, A. & STUR, A. W. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet*, 368: 1575-80, 2006.

GEGIA, M.; MDIVANI, N.; MENDES, R. E.; LI, H.; AKHALAIA, M.; HAN, J.; KHECHINASHVILI, G. & TANG, Y. W., Prevalence of and Molecular Basis for Tuberculosis Drug Resistance in the Republic of Georgia: Validation of a QIAplex System for Detection of Drug Resistance-Related Mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 725-729, 2008.

GILLESPIE, S.H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2): 267-274, 2002.

GOODFELLOW, M. & MAGGE, J. G. Taxonomy of mycobacteria. *In* GANGADHARAM P. R. J.; JENKINS, P. A. (ed). *Mycobacteria – Basic aspects*. New York: Chapman & Hall, 1998.

GRYADUNOV, D.; MIKHAILOVICH, V. & LAPA, S. Evaluation of hybridization on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology and Infection*, 11: 531-9, 2005.

HAAS, W. H.; SCHILKE, K.; BRAND, J.; AMTHOR, B.; WEYER, K.; FOURIE, P. B.; BRETZEL, G.; STICHT-GROH, V. & BREMER, H. J. Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 1601-1603, 1997.

HARSHEY, R. M. & RAMAKRISHNAN, T. Rate of ribonucleic acid chain growth in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Journal of Bacteriology*, 129: 616-22, 1977.

HAZBON, M. H.; BRIMACOMBE, M.; BOBADILLA DEL VALLE, M.; CAVATORE, M.; GUERRERO, M. I.; VARMA-BASIL, M.; BILLMAN-JACOBE, H.; LAVENDER, C.; FYFE, J.; GARCIA-GARCIA, L.; LEON, C. I.; BOSE, M.; CHAVES, F.; MURRAY, M.; EISENACH, K. D.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; CAVE, M. D.; PONCE DE LEON, A. & ALLAND, D. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 2640-9, 2006.

HEIFETS, L. B. & GOOD, R. C. Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis (chapter 7). *In*: BLOOM, B. R. (Ed.). *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington: ASM, 1994.

HEIFETS, L. B. Clinical mycobacteriology. Drug susceptibility testing. *Clinical Laboratory Medicine*, 16: 641-56, 1996.

HEIFETS, L. B. & CANGELOSI, G. A. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: a neglected problem at the turn of the century. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 3: 564-81, 1999.

HEIFETS, L. B. Conventional methods for antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. In: BASTIAN, I. & PORTAELS, F. (ed). Multidrug-resistant Tuberculosis. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000.

HEYM, B. & COLE, S. T. Isolation and characterization of isoniazid-resistant mutants of *Mycobacterium smegmatis* and *M. aurum*. *Research in Microbiology*, 143: 721-30, 1992.

HEYM, B.; ZHANG, Y.; POULET, S.; YOUNG, D. & COLE, S. T. Characterization of the *katG* gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 175: 4255-4259, 1993.

HEYM, B.; SAINT-JOANIS, B. & COLE, S. T. The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 79: 267-271, 1999.

HILLEMANN, D.; KUBICA, T.; AGZAMOVA, R.; VENERA, B.; RUSCH-GERDES, S. & NIEMANN, S. Rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Kazakhstan. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 9:1161-7, 2005.

HILLEMANN, D.; WEIZENEGGER, M.; KUBICA, T.; RICHTER, E. & NIEMANN, S. Use of the GenoType MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid

resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 3699-703, 2005.

HILLEMANN, D.; RUSCH-GERDES, S. & RICHTER, E. Application of the GenoType MTBDR assay directly on sputum specimens. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 10: 1057-9, 2006.

HILLEMANN, D.; RUSCH-GERDES, S. & RICHTER, E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 2635-40, 2007.

HOFLING, C. C.; PAVAN, E. M.; GIAMPAGLIA, C. M.; FERRAZOLI, L.; AILY, D. C.; DE ALBUQUERQUE, D. M. & RAMOS, M. C. Prevalence of *katG* Ser315 substitution and *rpoB* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 9: 87-93, 2005.

HOPEWELL, P. C. Overview of Clinical Tuberculosis. In: BLOOM, B. R. (ed.). *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington: ASM, 1994.

IDIGORAS, P.; BERISTAIN, X.; ITURZAETA, A.; VICENTE, D. & PEREZ-TRALLERO, E. Comparison of the automated nonradiometric Bactec MGIT 960 system with Lowenstein-Jensen, Coletsos, and Middlebrook 7H11 solid media for recovery of mycobacteria. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 19: 350-4, 2000.

ISEMAN, M. D.; COHN, D.L. & SBARDARO, J. A. Directly observed treatment of tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 328: 576-578, 1993.

ISEMAN, M.D. Evolution of drug-resistant tuberculosis: a tale of two species. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91: 2428-2429, 1994.

IUATLD. INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE. Management of Tuberculosis. A guide for Low income countries. 5^aed. Paris, France: 2000.

JIAO, W. W.; MOKROUSOV, I.; SUN, G. Z.; LI, M.; LIU, J. W.; NARVSKAYA, O. & SHEN, A. D. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China. *Chinese Medical Journal (Engl)*, 120: 814-9, 2007.

JOHANSEN, I. S.; THOMSEN, V.O.; MARJAMAKI, M.; SOSNOVSKAJA, A. & LUNDGREN, B. Rapid, automated, nonradiometric susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex to four first-line antituberculous drugs used in standard short-course chemotherapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 50: 103-7, 2004.

JUREEN, P.; WERNGREN, J. & HOFFNER, S. E. Evaluation of the line probe assay (LiPA) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 84: 311-6, 2004.

KAPETANAKI, S. M.; CHOUCANE, S.; YU, S.; ZHAO, X.; MAGLIOZZO, R. S. & SCHELVIS, J. P. *Mycobacterium tuberculosis* KatG (S315T) catalase-peroxidase retains all active site properties for proper catalytic function. *Biochemistry*, 44: 243-52, 2005.

KAPUR, V.; LI, L. L.; HAMRICH, M. R.; PLIKAYTIS, B. B.; SHINNICK, T. M.; TELENTI, A.; JACOBS JR, W. R.; BANERJEE, A.; COLE, S. T.; YUEN, K. Y.; CLARRIGJE III, J. E.; KREISWIRTH, B. N. & MUSSER, J. M. Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 119: 131-138, 1995.

KAUFMANN, S. H. E. A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: Those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis*, 83: 86-90, 2003.

KENT, P. T. & KUBICA, G. P. Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory., Atlanta, USA: CDC, 1985.

KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D. & VAM ZETTEN, M. PCR + Reverse Line Blot Hybridization (PHL) to detect rifampin resistance. Laboratory Manual. National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, 1997.

KREMER, L., BAULARD, A. R., & BESRA, G. S. Genetics of mycolic acid biosynthesis. *In: HATFULL, G. F. & JACOBS JR, W. R. Molecular Genetics of Mycobacteria. ASM, 2000.*

KRITSKI, A. L.; CONDE, M. B., & JAMAL, L. Tuberculose e infecção pelo HIV: aspectos atuais sobre diagnóstico, tratamento e prevenção. *Boletim de Pneumologia Sanitária*, 6(2): 53-61, 1998.

KRITSKI, A. L.; CONDE, M. B., & MUZY-SOUZA, G. Tuberculose: do ambulatório à enfermaria. 2ªed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

KUBICA, G. P. & KENT, P. T. The sputum digestion process in the mycobacteriology laboratory: contributions of centrifugal-efficiency and digestant toxicity. CDC, Proceedings on Laboratory of Mycobacteriology, 1985.

LAZLO A.; RAHMAN, M.; RAVIGLIONE, M. C. & BUSTREO, F. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Laboratory Network: first round of proficiency testing. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 1: 231-238, 1997.

LEE, A. S. G.; TEO, A. S. M. & WONG, S. Y. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 2157-2159, 2001.

MARIANI, F.; GOLETTI, D.; CIARAMELLA, A.; MARTINO, A.; COLIZZI, V. & FRAZIANO, M. Macrophage response to *Mycobacterium tuberculosis* during HIV infection: relationships between macrophage activation and apoptosis. *Current Molecular Medicine*, 1: 209-16, 2001.

MARTIN, A. & PORTAELS, F. Drug Resistance and Drug Resistance Detection (Chapter 19). In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C. & RITACCO, V. *Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care*. 1^a ed. 2007.

MARTTILA, H. J.; SOINI, H., HUOVINEN, P. & VILJANEN, M. K. *katG* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from finnish patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40: 2187-2189, 1996.

MARTTILA, H. J.; SOINI, H.; EEROLA, E.; VYSHNEVSKAYA, E.; VYSHNEVSKAYA, B. I.; OTTEN, T. F.; VASILYEF, A. V. & VILJANEN, M. K. A Ser315Thr substitution in *KatG* is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 2443-2445, 1998.

MCKEEGAN, K. S.; BORGES-WALMSLEY, M. I. & WALMSLEY, A. R. Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends in Microbiology*, 10: S8-14, 2002.

MDLULI, K.; SHERMAN, D. R. & HICKEY, M. J. Biochemical and genetic data suggest that *inhA* is not the primary target for activated isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infectious Diseases*, 174: 1085–1090, 1996.

MDLULI, K.; SLAYDEN, R. A.; ZHU, Y.; RAMASWAMY, S.; PAN, X.; MEAD, D., CRANE, D. D.; MUSSER, J. M. & BARRY III, C. E. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* β -Ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science*, 280: 1607-1610, 1998.

METCALFE, C.; MACDONALD, I. K.; MURPHY, E. J.; BROWN, K. A.; RAVEN, E. L. & MOODY, P. C. The Tuberculosis Prodrug Isoniazid Bound to Activating Peroxidases. *The Journal of biological chemistry*, 283: 6193-6200, 2008.

METCHOCK, B. G.; NOLTE, F. S. & WALLACE Jr, R. J. Mycobacterium. In: MURRAY, P. R. (ed). Manual of clinical microbiology. 7^a ed. ASM, 1999.

MIDDLEBROOK, G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazid and the incidence of variants resistant to the drug *in vitro*. *American Review of Tuberculosis*, 65: 765-767, 1952.

MIDDLEBROOK, G. Isoniazid resistance and catalase activity of tubercle bacilli. *American Review of Tuberculosis*, 69: 471-412, 1954.

MIOTTO, P.; PIANA, F.; PENATI, V.; CANDUCCI, F.; MIGLIORI, G. B. & CIRILLO, D. M. Use of GenoType MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 2485-91, 2006.

MITCHISON, D. A. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle*, 66: 219-226, 1985.

MOKROUSOV, I.; NARVSKAYA, O.; OTTEN, T.; LIMESCHENKO, E.; STEKLOVA, L. & VYSHNEVSKIY, B. High prevalence of *KatG* Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1417-24, 2002.

MORCILLO, N.; ZUMARRAGA, M.; ALITO, A.; DOLMANN, A.; SCHOULS, L.; CATALDI, A., KREMER, K. & VAN SOOLINGEN, D. A low cost, home made, reverse line blot hybridization assay for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 6(11): 959-965, 2002.

MORGAN, M.; KALANTRI, S.; FLORES, L. & PAI, M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 5: 62, 2005.

MUSSER, J. M. Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular genetic insights. *Clinical Microbiology Reviews*, 8: 496-514, 1995.

MUSSER, J. M.; KAPUR, V.; WILLIAMS, D. L.; KREISWIRTH, B. N.; VAN SOOLINGEN, D. & VAN EMBDEN, J. D. A. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *Journal Infectious Diseases*, 173: 196-202, 1996.

NIKAIDO, H. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion in Microbiology*, 1: 516-523, 1998.

NUSRATH UNISSA, A.; SELVAKUMAR, N.; NARAYANAN, S. & NARAYANAN, P. R. Molecular analysis of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31: 71-75, 2008.

PABLOS-MENDEZ, A.; RAVIGLIONE, M. C.; LASZLO, A.; BINKIN, N.; RIEDER, H. L.; BUSTREO, F.; COHN, D. L.; LAMBREGTS-VAN WEEZENBEEK, C. S.; KIM, S. J.; CHAULET, P. & NUNN, P. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. *New England Journal of Medicine*, 338: 1641-1649, 1998.

PARK, Y. Z.; KIM, B. J.; RYU, S.; KOOK, Y. H.; CHOE, Y. K.; BAI, G. H., & KIM, S.J. Cross-resistance between rifampicin and KRM-1648 is associated with specific *rpoB* alleles in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 6(2): 166-170, 2002.

PASSAGLIA, L. M. P. Mutação, mecanismo de reparo do DNA e recombinaç o. In: ZAHA, A. (Coord). *Biologia Molecular Básica*. 2^a ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2000.

PETRINI, B. & HOFFNER, S. Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. *International Journal of Antimicrobial Agent*, 13: 93-97, 1999.

PFYFFER, G. S.; BONATO, D. A.; ERAHIMZADEH, A.; GROSS, W.; HOTALING, J.; KOMBLUM J.; LAZLO, A.; ROBERTS, G.; SALFINGER, M.; WITWERT, F. & SIDDIQI, S. Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the proportion method with solid media. *Journal Clinical Microbiology*, 37(10): 3179-3186, 1999.

PIATEK, A. S.; TELENTI, A.; MURRAY, M. R.; EL-HAJJ, H.; JACOBS, Jr. W. R.; KRAMER, F. R. & ALLAND, D. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 103-110, 2000.

PYM, A. S.; SAINT-JOANIS, B. & COLE, S. T. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infection and Immunity*, 70:4955-60, 2002.

QUY, H. T.; LAN, N. T.; BORGDORFF, M. W.; GROSSET, J.; LINH, P. D.; TUNG, L. B.; VAN SOOLINGEN, D.; RAVIGLIONE, M.; CO, N. V. & BROEKMANS, J. Drug resistance among failure and relapse cases of tuberculosis: is the standard

re-treatment regimen adequate? *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 7: 631-636, 2003.

RAMASWAMY, S. & MUSSER, J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 79: 3-29, 1998.

RAMASWAMY, S. V.; REICH, R.; DOU, S. J.; JASPERSE, L.; PAN, X.; WANGER, A.; QUITUGUA, T. & GRAVISS, E. A. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 1241-50, 2003.

RAVIGLIONE, M. C & SMITH, I. M. XDR Tuberculosis – Implications for Global Public Health. *The New England journal of medicine*, 356 (7): 656-659, 2007.

RINDER, H.; MIESKES, K. T. & LOSCHER, T. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 5: 339-45, 2001.

ROSSAU, R.; TRAORE, H.; BEENHOUWER, H.; MIJS, W.; JANNES, G.; RIJK, P. & PORTAELS, F. Evaluation of the INNO-LiPA Rif.TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(10): 2093-2098, 1997.

ROSSETTI, M. L. R; JARDIM, S. B.; RODRIGUES, V. F. S.; MOURA, A. R.; OLIVEIRA, H. & ZAHA, A.; Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *Journal of Microbiological Methods*, 28: 139-146, 1997.

ROSSETTI, M. L. R.; VALIM, A. R. M.; SILVA, M. S. N. & RODRIGUES, V. S. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Revista de Saúde Pública*, 36: 525-532, 2002.

ROUILLON, A.; PERDRIZET, S. & PARROT, R. Transmission of tubercle bacilli: the effects of chemotherapy. *Tubercle*, 57: 275-99, 1976.

ROUSE, D. A.; LI, Z.; BAI, G. H. & MORRIS, S. L. Characterization of the *katG* and *inhA* genes of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 2472-2477, 1995.

RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35 (1): 51-58, 2002.

RUIZ, P.; ZEROLO, F. J. & CASAL, M. J. Comparison of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using the ESP culture system II with that using the BACTEC method. *Journal Clinical Microbiology*, 38: 4663-4, 2000.

RUSCH-GERDES, S.; PFYFFER, G. E.; CASAL, M.; CHADWICK, M. & SIDDIQI, S. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials. *Journal Clinical Microbiology*, 44: 688-92, 2006.

SAINT-JOANIS, B.; SOUCHON, H.; WILMING, M.; JOHNSON, K.; ALZARI, P. M. & COLE, S. T. Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/oxidase, *KatG*, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemical Journal*, 338: 753-60, 1999.

SAJDUDA, A.; BRZOSTEK, A. & POPLAWSKA, M. Molecular characterization of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *Journal Clinical Microbiology*, 42: 2425-31. 2004.

SCORPIO, A.; COLLINS, D. M.; WHIPPLE, D.; CAVE, D.; BATES, J. & ZHANG, Y. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *Journal Clinical Microbiology*, 32: 106-110, 1997.

SES-RS. Secretaria Estadual da Saúde, Estado do Rio Grande do Sul, Coordenação de Atenção Integral à Saúde, Coordenação de Pneumologia Sanitária, Tuberculose, 2007.

SHAH, N. S.; WRIGHT, A. & BAI, G.H. Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 380-7, 2007.

SHAMPUTA, I. C.; RIGOUTS, L. & PORTAELS, F. Molecular genetic methods for diagnosis and antibiotic resistance detection of mycobacteria from clinical specimens. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 112: 728-52, 2004.

SHARMA, S. K. & LIU, J. J. Progress of DOTS in global tuberculosis control. *Lancet*, 367: 951-2, 2006.

SHI, R.; ITAGAKI, N. & SUGAWARA, I. Overview of anti-tuberculosis (TB) drugs and their resistance mechanisms. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 7(11):1177-85, 2007.

SILVA, M. S.; SENNA, S. G.; RIBEIRO, M. O.; VALIM, A. R.; TELLES, M. A.; KRITSKI, A.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C.; ZAHA, A. & ROSSETTI, M. L. Mutations in katG, inhA, and ahpC genes of brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal Clinical Microbiology*, 41: 4471-4, 2003.

SILVA, P. A. & AÍNSA, J. A. Drugs and Drug Interactions (chapter 18). In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C. & RITACCO, V. *Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care*. 1ª ed. 2007.

SILVA, P. E. A.; MONTAÑES, C. M. & AÍNSA, J. A. Tuberculose: história e perspectivas atuais. *Vittalle*, 15(1): 71-78, 2003.

SOINI, H. & MUSSER, J. M. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clinical Chemistry*, 47(5): 809-814, 2001.

SOMOSKOVI, A.; DORMANDY, J.; MITSANI, D.; RIVENBURG, J. & SALFINGER, M. Rapid direct detection and susceptibility testing of the *Mycobacterium tuberculosis* complex for isoniazid and rifampin in smear positive clinical specimens by the PCR-based GenoType MTBDR assay. *Journal Clinical Microbiology*, 44: 4459-63, 2006.

SMITH, P. G. & MOSS, A. R. Epidemiology of tuberculosis (chapter 4). In: BLOOM, B. R. (Ed.). Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington: ASM, 1994.

STEAD, W. W. & DUTT, A. K. Epidemiology and host factors. In: SCHLOSSBERG, D. Tuberculosis. 2^a ed. New York, 1989.

STEAD, W. W. & LOFGREN J. P. Racial differences in susceptibility to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *New England Journal of Medicin*, 322: 422, 1990.

STEAD, W. W. & BATES, J. H. Geographic and evolutionary epidemiology of tuberculosis. In ROM ,W & GARAY, S: Tuberculosis. New York: Little Brown and Company, 1995.

STEELE, J. H. & RANNEY, A. F. Animal tuberculosis. *Am Ver Tuberc*, 77: 908-22, 1958.

STYBLO, K. & MEIJER, J. Impact of BCG vaccination programmes in children and young adults on the tuberculosis problem. *Tubercle*, 57(1): 17-43, 1976.

STYBLO, K. & ROUILLO, A. Estimated global incidence of smear positive pulmonary tuberculosis. Unreliability of officially reported figures on tuberculosis. *Bull. Int. Union Tubercle*, 56: 118-125, 1981.

STEWART, S. M.; HALL, E.; RIDDELL, R. W. & SOMNER, A. R. Bacteriological aspects of the use of ethionamide, pyrazinamide and cycloserine in the treatment of chronic pulmonary tuberculosis. *Tubercle*, 43: 417-431, 1962.

SURESH, N.; SINGH, U. B.; GUPTA, C.; ARORA, J.; RANA, T. & SAMANTARAY, J. C. Rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly from stained sputum smears using single-tube nested polymerase chain reaction deoxyribonucleic acid sequencing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58: 217-22, 2007.

SYRE, H.; PHYU, S.; SNDVEN, P.; BJORVATH, B. & GREWAL, M. S. Rapid colorimetric method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin in liquid cultures. *Journal Clinical Microbiology*, 41(11): 5173-5177, 2003.

TAKIFF, H. E. The molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In BASTIAN, I. & PORTAELS, F. (ed). Multidrug-resistant tuberculosis. *Klawer Academic Publishers*, 2000.

TAYLOR, G. M.; STEWART, G. R.; COOKE, M.; CHAPLIN, S.; LADVA, S.; KIRKUP, J.; PALMER, S. & YOUNG, D. B. Koch's Bacillus – a look at the first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. *Microbiology*, 149: 3213-3220, 2003.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; SCHIDHEINI, T. & BODMER, T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(10): 2054-2058, 1993a.

TELENTI, A.; LOWRIE, D.; MATTER, L.; IMBODEN, P.; COLE, S.; SCHOPFER, K.; MARCHESI, F.; COLSTON, M. J. & BODMER, T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*, 341: 647-650, 1993b.

TIMMINS, G. S. & DERETIC, V. Mechanisms of action of isoniazid. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 62: 1220-1227, 2006.

TOMAN, K. Tuberculosis case-finding and chemotherapy – questions and answers. WHO, 1979.

TRAORE, H.; VAN DEUN, A.; SHAMPUTA, I. C.; RIGOUTS, L. & PORTAELS, F. Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis*-complex DNA and rifampin resistance in clinical specimens from tuberculosis patients by the line probe assay; a large scale study. *Journal Clinical Microbiology*, 44: 4384-8, 2006.

TRUJILLO, W. F. C. & KRITSKI, A. L. Tuberculose. *In: Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Ed Cultura Médica, 2001.

VAN DOORN, H. R.; KUIJPER, E. J.; VAN DER ENDE, A.; WELTEN, A. G.; VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P. E. & DANKERT, J. The susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and the Arg-Leu mutation at codon 463 of *katG* are not associated. *Journal Clinical Microbiology*, 39: 1591-4, 2001.

VAN DOORN, H. R.; DE HAAS, P. E.; KREMER, K.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; BORGDORFF, M. W. & VAN SOOLINGEN, D. Public health impact of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a mutation at amino-acid position 315 of *katG*: a decade of experience in The Netherlands. *Clinical Microbiology and Infection*, 12: 769-75, 2006.

VAN RIE, A.; WARREN, R.; MSHANGA, I.; JORDAAN, A. M.; VAN DER SPUIY, G. D.; RICHARDSON, M.; SIMPSON, J.; GIE, R. P.; ENARSON, D. A.; BEYERS, N.;

VAN HELDEN, P. D. & VICTOR, T. C. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community. *Journal Clinical Microbiology*, 39: 636-41, 2001.

VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P. E.; VAN DOORN, H. R.; KUIJPER, E.; RINDER, H. & BORGDORFF, M. W. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *Journal of Infectious Diseases*, 182: 1788-90, 2000.

VICTOR, T. C.; JORDAAN, A. M.; VAN RIE, A.; VAN DER SPUIY, G. D.; RICHARDSON, M.; VAN HELDEN, P. D. & WARREN, R. Detection of mutations in drug resistance genes of *Mycobacterium tuberculosis* by a dot-blot hybridization strategy. *Tubercle and Lung Disease*, 79: 343-8, 1999.

VIVEIROS, M.; LEANDRO, C. & AMARAL, L. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22: 274-278, 2003.

WAHL, S. M.; GREENWELL-WILD, T.; PENG, G.; HALE-DONZE, H. & ORENSTEIN, J. M. Co-Infection with opportunistic pathogens promotes human immunodeficiency virus type 1 infection in macrophages. *Journal of Infectious Diseases*, 179: 457-460, 1999.

WATTERSON, A. S. & DROBNIEVSKI, F. A. A. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. *Journal of Clinical Pathology*, 53(10): 727-732, 2000.

WEI, C. J.; LEI, B.; MUSSER, J. M. & TU, S. C. Isoniazid activation defects in recombinant *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) mutants evident in *InhA* inhibitor production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 670-5, 2003.

WILSON, T. M. & COLLINS, D. M. *ahpC*, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Molecular Microbiology*, 19: 1025-1034, 1996.

World Bank. World development report 1993: investing in health. New York: Oxford University, 1993.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUALTD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 1994-1997. (WHO/TB/97.229). Geneva, 1997.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. What is DOTS? A guide for understanding the WHO recommended TB control strategy known as DOTS. (WHO/CSD/CPC/TB.99.270). Geneva, 1999.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for establishing DOTS-PLUS. Pilot projects for the management of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Scientific panel of the working group on DOTS-Plus for MDR-TB. (WHO/TB/2000.279). Geneva, 2000a.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUALTD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Report 2: Prevalence and trends. (WHO/CDS/TB/2000.278). Geneva, 2000b.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Global strategy for containment of antimicrobial resistance. (WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2). Geneva, 2001.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The newsletter of the global partnership movement Stop TB, 2002.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUALTD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Third Global Report. (WHO/HTM/TB/2004.343). Geneva, 2004.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Stop TB Partnership. The Stop TB Strategy. Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related millennium development goals. (WHO/HTM/TB/2006.368). Geneva, 2006.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control – surveillance, planning, financing. WHO Report 2008.

WU, X. Q.; LU, Y.; ZHANG, J. X.; LIANG, J. Q.; LI, H. M.; ZHANG, G. Y.; LU, C. H. & DING, B. C. Detection of the mutations in *katG* 315 and *inhA* -15 of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Chinese patients. *Chinese Medical Journal (Engl)*, 119: 230-3, 2006.

www.hain-lifescience.com/pdf/304xx_pbl.pdf (Data de acesso: 24/04/2008).

www.who.int/tb (Data de acesso: 15/05/2008).

www.who.int/tb/xdr/taskforcereport_oct06.pdf (Data de acesso: 03/06/2008).

ZAKERBOSTANABAD, S.; TITOV, L. P. & BAHRMAND, A. R. Frequency and molecular characterization of isoniazid resistance in *katG* region of MDR isolates from tuberculosis patients in southern endemic border of Iran. *Infection, genetics and evolution*, 8: 15-9, 2008.

ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B.; YOUNG, D. & COLE, S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, 358: 591-593, 1992.

ZHANG, Y.; GARBE, T. & YOUNG, D. Transformation with *katG* restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentration. *Molecular Microbiology*, 8: 521-524, 1993.

ZHANG, Y. & YOUNG, D. Molecular mechanisms of isoniazid: a drug at the front line of tuberculosis control. *Trends in Microbiology*, 1: 109-113, 1993.

ZHANG, Y. & TELENTI, A. Genetics of drugs resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. Washington: ASM, 2000.

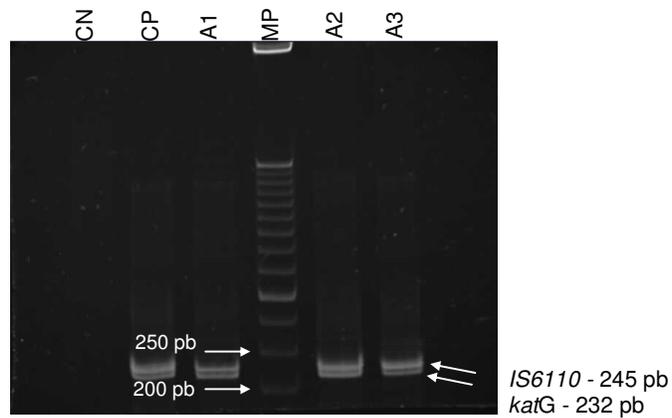
ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45: 529-564, 2005.

ZHANG, M.; YUE, J.; YANG, Y. P.; ZHANG, H. M.; LEI, J. Q.; JIN, R. L.; ZHANG, X. L. & WANG, H. H. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *Journal Clinical Microbiology*, 43: 5477-82, 2005.

ZHANG, S. L.; SHEN, J. G.; XU, P. H.; LI, D. X.; SUN, Z. Q.; LI, L.; YANG, Z. R. & SUN, Q. A novel genotypic test for rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by a multiplex probe array. *Journal of applied microbiology*, 103: 1262-1271, 2007.

7. APÊNDICES

Apêndice 1. Fragmentos gerados pelo PCR Duplex utilizando os *primers* katG1/katG2 e IS1/IS2.



Gel de Poliacrilamida 10% corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador UV. CN: controle negativo; CP: controle positivo (H37Rv); A1, A2, A3: amostras representativas; MP: marcador de peso molecular de 50 pb.

Apêndice 2. Lista dos aminoácidos e os códons no código genético. Adaptado de BRUCE *et al.*, 1997.

| | | | | |
|---|-----|-----------------|-----|---------------------|
| A | Ala | Alanina | GCA | GCC GCG GCU |
| C | Cys | Cisteína | UGC | UGU |
| D | Asp | Ácido Aspartico | GAC | GAU |
| E | Glu | Ácido Glutâmico | GAA | GAG |
| F | Phe | Fenilalanina | UUC | UUU |
| G | Gly | Glicina | GGA | GGC GGG GGU |
| H | His | Histidina | CAC | CAU |
| I | Ile | Isoleucina | AUA | AUC AUU |
| K | Lys | Lisina | AAA | AAG |
| L | Leu | Leucina | UUA | UUG CUA CUC CUG CUU |
| M | Met | Metionina | AUG | |
| N | Asn | Asparagina | AAC | AAU |
| P | Pro | Prolina | CCA | CCC CCG CCU |
| Q | Gln | Glutamina | CAA | CAG |
| R | Arg | Arginina | AGA | AGG CGA CGC CGG CGU |
| S | Ser | Serina | AGC | AGU UCA UCC UCG UCU |
| T | Thr | Treonina | ACA | ACC ACG ACU |
| V | Val | Valina | GUA | GUC GUG GUU |
| W | Trp | Triptofano | UGG | |
| Y | Tyr | Tirosina | UAC | UAU |

Apêndice 3: CURRICULUM VITAE RESUMIDO

VERZA, M.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Mirela Verza

Local e data de nascimento: Antônio Prado, RS - Brasil - 14/12/1977

Endereço profissional: CDCT/FEPPS - Av. Ipiranga, 5400 (3º andar) - Porto Alegre/RS, CEP: 90610-000

Telefone profissional: (51) 3352.03.36/(51) 8426.36.56

Email: mimivz@gmail.com

2. FORMAÇÃO E CURSOS:

CURSO DE FARMÁCIA – Universidade Luterana do Brasil, Jul/1996 -
Jan/2001.

- Treinamento no Laboratório de Biologia Molecular aplicado à Micobactérias - Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Jun/ 2006;
- Curso de Biologia Molecular Básica, Instituto de Biociências, UFRGS, Jul/2005;
- Curso de Biologia Molecular Aplicada – Clonagem Gênica, Instituto de Biociências, UFRGS, Jul/2005;
- General English, Institute of Studies at St Helens, Auckland, Nova Zelândia, Fev/2004 - Mar/2004;
- General English, Edgware College, Londres, Inglaterra, Ago/2003 - Dez/2003;
- Curso Extensivo de Cosmetologia, Instituto Magistral, Porto Alegre, Abr/2001 - Dez/2001.

3. ESTÁGIOS:

- Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre, RS, Abr/2005 - Fev/2006 (Responsável: Maria Lúcia Rosa Rossetti): Pesquisadora na área de Biologia Molecular; desenvolvimento de kit diagnóstico para detecção de resistência na tuberculose e membro da Comissão de Controle de Qualidade.
- Hospital Militar de Porto Alegre (HGePA), Porto Alegre, RS, Estágio Curricular, Ago/2000 - Nov/2000 (Responsável: TC Sedi Antonio Turra): Manipulação de formulações, dispensação de medicamentos e nutrição enteral.
- Farmácia de Manipulação Natufarma, Caxias do Sul, RS, Estágio Voluntário, Dez/1999 - Jan/2000 (Responsável: Cezar R. de Moura Pires): Manipulação de medicamentos, cosméticos, homeopatia e florais.

4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR:

- CDCT/FEPPS, Porto Alegre, RS, Mar/2006 - Fev/2008: bolsista DTI (nível E), CNPq, Projeto “Desenvolvimento de um kit para Detecção Molecular do Papilomavírus Humano (HPV)”.
- Farmácia de Manipulação Quinta Essência, Porto Alegre, RS, Dez/2000 - Jul/2002: manipulação de medicamentos, cosméticos, homeopatia e florais. Controle de qualidade, supervisão de equipe técnica e atenção farmacêutica.
- Atividade Didática na ULBRA, Canoas, RS, Jun/2007: Projeto de Extensão do Curso de Biomedicina intitulado Educação Continuada em Laboratório

de Saúde Pública na Área de Epidemiologia e Pesquisa de Doenças Infecto-contagiosas - 15hs/aula.

5. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:

- MASCHMANN, R.; VERZA, M.; SILVA, S. N.; ROSSETTI, M. L. R. Estocagem e transporte de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* para utilização em Biologia Molecular. 44^º Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, Porto Alegre, RS, Mar/2008.
- VERZA, M.; MASCHMANN, R.; SILVA, S. N.; ZAHA, A.; ROSSETTI, M. L. R. Identificação da mutação do códon 315 no gene *katG* em *Mycobacterium tuberculosis*. 24^º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Brasília, DF, Out /2007.
- VERZA, M.; MASCHMANN, R.; SILVA, S. N.; ROSSETTI, M. L. R. Detecção molecular de resistência à isoniazida em isolados de *Mycobacterium tuberculosis*. 2^º Encontro Nacional de Tuberculose, São Paulo, SP, Jul/2006.

Apêndice 4. Comprovante da submissão do artigo para revista *Journal of Microbiological Methods*.

Elsevier Editorial System - Microsoft Internet Explorer

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Endereço <http://ees.elsevier.com/mimet/default.asp>

Journal of Microbiological Methods Contact us Help ?

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out Username: Maria Lúcia Role: Author EES Version: 5.0

Submissions Being Processed for Author Maria Lúcia R Rossetti, Ph.D

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

| Action | Manuscript Number | Title | Initial Date Submitted | Status Date | Current Status |
|------------------------------|-------------------|---|------------------------|--------------|----------------------|
| Action Links | | Development of a colorimetric reverse hybridization assay for detection of the mutation most frequently associated with resistance to isoniazid in Mycobacterium tuberculosis | Jul 04, 2008 | Jul 04, 2008 | Submitted to Journal |

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Help | Privacy Policy | Terms and Conditions © 2006 - 2007 Elsevier BV.

Concluído Internet

Iniciar Gmail - Caixa d... Elsevier Editori... MIMI (F:) DISSERTAÇÃO... Documento1 - ... 11:10