

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

CELULAR E MOLECULAR

**IDENTIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES MAIS FREQUENTES RELACIONADAS
COM A RESISTÊNCIA A RIFAMPICINA E ISONIAZIDA EM *Mycobacterium
tuberculosis* NOS GENES *rpoB*, *katG* E *inhA* ATRAVÉS DE MÉTODO
MOLECULAR COM DETECÇÃO COLORIMÉTRICA**

SÉRGIO LUIZ MONTEGO FERREIRA JÚNIOR

Porto Alegre, novembro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

CELULAR E MOLECULAR

**IDENTIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES MAIS FREQUENTES RELACIONADAS
COM A RESISTÊNCIA A TUBERCULOSE NOS GENES *rpoB*, *katG* E *inhA*
ATRAVÉS DE UM MÉTODO MOLECULAR DE DETECÇÃO
COLORIMÉTRICA**

SÉRGIO LUIZ MONTEGO FERREIRA JÚNIOR

**Tese submetida ao Programa de
Pós Graduação em Biologia Celular
e Molecular da UFRGS como
requisito parcial para a obtenção
do grau de mestre em ciências**

Orientador: Dra. Maria Lúcia Rosa Rossetti

Porto alegre, novembro de 2012

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIODORAS

O presente estudo foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). O projeto recebeu financiamento do CNPq.

AGRADECIMENTOS

À orientadora Dra. Maria Lucia Rossetti, minha gratidão pela confiança, carinho, ensinamentos e principalmente pela oportunidade de desenvolver este trabalho e minha profissão.

À comissão de acompanhamento Dr. Arnaldo Zaha e Dra. Marilene Vainsntein pela colaboração neste trabalho.

À garotinha Raquel Maschmann que, além de me passar muito conhecimento sobre a ciência, foi grande amiga de longas conversas a respeito da vida. Importante ressaltar que a conclusão que chegamos é “deixa rolar...”

Ao Vico que me fez ter um olhar diferente a respeito da ciência. Agradeço pelas oportunidades, amizade e pelas conversas sempre motivadoras!!!

Às colegas Elis e Márcia que sempre colaboraram para a realização de todas as etapas do trabalho.

Ao Benerson, aluno sempre dedicado e de extrema importância para a realização do trabalho.

Ao pessoal do laboratório em especial a Regina (dalhe tricolor), Karen, Mirela Marish, Lila, Tati, Rubiazinha, Carol, Lucas, Léo's. Pela amizade, por compartilhar o conhecimento e todas as discussões sempre proveitosas... ou não!!!

Aos funcionários do PPGBCM, Sílvia e Luciano por todo apoio nos bastidores que é indispensável.

À minha família, pai Sérgio, minha mãe Eliane, meus irmãos Rafael e Fernanda e ai dinda Nancy. Base para tudo, meu maior bem, que sempre me apoiaram em todas as decisões e sabem a importância da realização deste sonho.

MUITO OBRIGADO.

"Imagination is more important than knowledge" (Albert Einstein)

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Lista de abreviaturas | 7 |
| Lista de figuras | 9 |
| Listas de tabelas | 10 |
| Resumo | 11 |
| Abstract | 12 |
| Capítulo 1 Introdução | |
| Apresentação..... | 14 |
| Tuberculose – Breve histórico..... | 15 |
| Epidemiologia..... | 16 |
| Etiologia – <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 19 |
| Mecanismos de transmissão da TB..... | 20 |
| Infecção..... | 21 |
| Tratamento..... | 22 |
| Tratamento – MDR-TB..... | 24 |
| Tuberculose e HIV..... | 25 |
| Resistência aos fármacos..... | 27 |
| Multidroga resistência – MDR..... | 28 |
| Mecanismo de ação e resistência aos fármacos..... | 29 |
| Isoniazida..... | 30 |
| Rifampicina..... | 31 |
| Pirazinamida..... | 32 |
| Etambutol..... | 33 |
| Diagnóstico..... | 34 |
| Métodos disponíveis para detecção da resistência..... | 36 |
| Metodologias fenotípicas..... | 36 |
| Metodologias genotípicas..... | 38 |
| Justificativa..... | 40 |

| | |
|---|----|
| Objetivos..... | 41 |
| Objetivos gerais..... | 41 |
| Objetivos específicos..... | 41 |
| | |
| Capítulo 2 Detecção rápida de mutações nos genes <i>rpoB</i> , <i>katG</i> e <i>inhA</i> em isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistentes a rifampicina e isoniazida através de sondas fixadas em membranas..... | 43 |
| | |
| Capítulo 3 Discussão geral..... | 71 |
| Perspectivas..... | 78 |
| Currículo Lattes resumido..... | 91 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

| | |
|----------|--|
| AIDS | <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> |
| BCIP | 5- bromo-4-chloro-3-indoyl Fosfato |
| BCG | Bacilo Calmette Guérin |
| BSA | Albumina de soro de bovino |
| BK | Bacilo de Koch |
| CDC | <i>Centers of Disease Control</i> |
| CDCT | Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| CMI | Concentração mínima inibitória |
| CPM | Ciprofloxacina |
| CFZ | Clofazimina |
| CTAB | Brometo de Cetil-Trimetil-amônio |
| DOTS | <i>Directly Observed Treatment Strategy</i> |
| EDAC | <i>1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride</i> |
| EDTA | Ácido Etilenodiaminotetracético |
| EMB | Etambutol |
| FEPPS/RS | Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana |
| INH | Isoniazida |
| IS | Sequência de inserção |
| LACEN-RS | Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul |
| LJ | Löwenstein-Jensen |
| MODS | <i>Microscopic Observation Broth Drug Susceptibility Assay</i> |
| MTC | Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| NBT | <i>Nitro Blue Tetrazolium</i> |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PAS | Ácido p-aminosalicílico |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PCR-SSCP | <i>Single Strand Conformation Polymorphism - PCR</i> |
| PEG | Polietilenoglicol |
| PNCT | Programa Nacional de Controle da Tuberculose |
| PZA | Pirazinamida |

| | |
|--------|---|
| RMP | Rifampicina |
| RRDR | <i>Rifampin-Resistance-Determining Region</i> |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| SSC | Cloreto de Sódio + Citrato de Sódio |
| SM | Estreptomicina |
| TE | Tris+EDTA |
| TEB | Tris-Borato-EDTA |
| TB | Tuberculose |
| TB-MDR | Tuberculose multi droga resistente |
| TB-TDR | Tuberculose totalmente resistente a droga |
| TB-XDR | Tuberculose extensivamente resistente a droga |
| TSA | Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa da incidência de novos casos de TB em 2010 (WHO, 2011a).

Figura 2. Incidência de casos de TB por estado brasileiro em 2011.

Figura 3. Incidência de tuberculose nos municípios ditos prioritários, onde se concentram 68% dos casos de Tuberculose no Rio Grande do Sul.

Figura 4. Mapa circular do cromossomo de *M. tuberculosis*

Figura 5. Estimativa da prevalência de HIV positivo, entre os casos novos de tuberculose.

Figura 6. Esquema de concepção no desenvolvimento de resistência de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 7. Notificação mundial absoluta de MDR-TB.

Figura 8. Ilustração da estrutura molecular da Isoniazida

Figura 9. Ilustração da estrutura molecular da Rifampicina

Figura 10. Ilustração da estrutura molecular da Pirazinamida

Figura 11. Ilustração da estrutura molecular da Etambutol

Figura 12. Colônias de *Mycobacterium tuberculosis* em meio Ogawa Kudoh

Figura 13. *Mycobacterium tuberculosis*.vista em eletromicrografia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Definição para fins de aplicação de esquemas terapêuticos

Tabela 2. Esquema medicamentoso (esquema I) para o tratamento de TB

Tabela 3 Esquema padronizado de tratamento para pacientes confirmados com MDR-TB.

Tabela 4. Índice de resistência natural de *M. tuberculosis* frente a cada fármaco

Tabela 5. Escala quantitativa para contagem de bacilos.

Tabela 6. Critérios para leitura e interpretação da cultura em meio sólido.

Tabela 7. Concentração crítica e proporção crítica.

RESUMO

Tuberculose (TB) Multidroga resistente (MDR) é definida como a doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*) com resistência ao menos a isoniazida (INH) e rifampicina (RMP), sendo um crescente problema de saúde pública em todo o mundo. A escolha do tratamento da tuberculose multiresistente (MDR-TB) deveria ser baseada em testes de suscetibilidade as drogas. Estes métodos são laboriosos e demorados, sendo comum ter que aguardar até mais de quatro semanas para obtenção do resultado. Por esta razão, a maioria dos pacientes é orientado a realizar o tratamento sem um teste de susceptibilidade. A detecção precoce do bacilo, bem como a detecção de sua resistência, é crucial para um tratamento adequado, evitando a propagação de cepas resistentes na comunidade. Os métodos baseados em biologia molecular, apesar de rápidos, costumam requerer o uso de equipamentos de alto custo, como o, sequenciador ou GeneXpert MTB/RIF o que inviabiliza a sua utilização na rotina dos laboratórios públicos no Brasil. Por estas razões, objetivamos padronizar uma metodologia de hibridização molecular em membranas (LINE-TB/MDR) capaz de detectar as mutações mais frequentemente relacionadas com resistência a RMP e a INH em isolados de *M. tuberculosis*, as duas principais drogas utilizadas no tratamento da doença. Sondas gênicas com estas mutações, localizadas nos genes *katG*, *rpoB* e *inhA*, foram fixadas em membrana de náilon para hibridizar com o produto de um PCR multiplex, permitindo a detecção rápida das mutações. O método foi validado em um painel de referência de 108 amostras devidamente caracterizadas pelo teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) e sequenciamento gênico. Quando comparado com o TSA a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo, para RMP foi 100% em todas as análises. Considerando a análise de resistência a INH, o teste obteve sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de 77%, 100%, 100% e 82% respectivamente. Quando comparado com o sequenciamento a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para RMP foi de 100% para todas as análises. Para resistência a INH a sensibilidade especificidade PPV e NPV foi 94,3%, 100%, 100% e 94,8% respectivamente. O método desenvolvido poderá ser utilizado como uma alternativa para a identificação rápida de cepas multirresistentes, além de permitir a identificação do complexo *M. tuberculosis*.

ABSTRACT

Multidrug-resistant (MDR) tuberculosis (TB), defined as the disease caused by a *Mycobacterium tuberculosis* strain with resistance to at least isoniazid (INH) and rifampicin (RMP), is a growing public health and clinical problem worldwide. The choice of treatment of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is often based on drug susceptibility testing (DST). Drug susceptibility testing by conventional methods takes more than 4 weeks. An accurate and early detection of drug resistance in *M. tuberculosis* isolates is crucial for appropriate treatment, and to prevent the development of further resistance and the spread of resistant strains. 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. For this reason, the aim of this study was to standardize a molecular hybridization method (LINE-TB/MDR) able to detect the most frequent mutations related to resistance to RMP and INH in *M. tuberculosis* isolates. Specific mutations found in the genes *rpoB*, *katg* and *inhA* have been reported as a marker for resistance to tuberculosis first line drugs. The assay was validated on a reference panel with 108 samples well-characterized by antimicrobial susceptibility testing (AST) and DNA sequencing. When compared to AST, the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the LINE-TB/MDR, were 100% for all analyses. For INH resistance, the sensitivity, specificity, PPV and NPV were 77%, 100%, 100% and 82% respectively. When compared with sequencing, the sensitivity, specificity, PPV and NPV of the LINE-TB/MDR, for RMP resistance, were 100% for all analyses. For INH resistance the sensitivity, specificity, PPV and NPV were 94,3%, 100%, 100% and 94.8% respectively. The developed assay could be used as an alternative for rapid identification of multi drug resistant (MDR) strains, and additionally, allowing the *M. tuberculosis* complex identification.

Capítulo 1

Introdução

INTRODUÇÃO

Apresentação

A tuberculose (TB) é uma das mais antigas doenças que afligem a humanidade e constitui umas das principais causas de morte em nosso país (BRASIL, 2010). É uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que atinge tipicamente os pulmões (TB pulmonar), mas também pode se instalar em outros sítios do organismo (TB extrapulmonar) (BROSCH *et al.*, 2002). A doença é transmitida pelo ar por pessoas doentes ao tossir, espirrar ou falar (CAPONE, 2006).

Atualmente, um terço da população mundial está latentemente infectada pelo bacilo da TB e destas, 10% irão desenvolver a doença ativa em algum momento da vida. Por outro lado, pacientes coinfetados com HIV tem a probabilidade de 10% ao ano de desenvolver TB ativa. Em 2010, foram notificados cerca de 7 milhões de casos de TB levando a morte de 1,4 milhões de pessoas (WHO, 2011a).

O método diagnóstico mais comum e barato de TB é a microscopia do escarro, onde é realizado a coloração de Zihel-Neelsen para observação da bactéria (CORADOS *et al.*, 2007). Em alguns países, com maior capacidade laboratorial, o diagnóstico da TB pode também ser obtido por métodos de cultura, ou em menores proporções, métodos moleculares rápidos (FATTORINI *et al.*, 2008; YAO *et al.*, 2010).

A TB, apesar de vitimar todas as camadas sociais, sempre acometeu mais expressivamente os seguimentos mais carentes da população e hoje, no contexto mundial, atinge principalmente os países em desenvolvimento. Ásia e África juntas somam 80% dos casos de tuberculose no mundo (ZAGER; MCNERNEY, 2008).

Apesar dos esforços para o controle da TB, existem problemas adicionais da doença, que incluem a desigualdade social (RICHARD *et al.*, 2001), o advento da AIDS, os movimentos migratórios, a falta de novos produtos para diagnóstico, falta de adesão ao tratamento, o abandono do tratamento e a má qualidade dos serviços de saúde e um número crescente do surgimento de cepas multirresistentes utilizados no tratamento (SUCHINDRAN *et al.*, 2009; RYLANCE *et al.*, 2010; RODRIGUES, LAURA *et al.*, 2007 ;PERKINS *et al.*, 2007).

Multidroga resistência (MDR-TB) é definida como resistência ao menos a rifampicina (RMP) e à isoniazida (INH) (SOOLINGEN *et al.*, 2011), que são os dois fármacos mais potentes contra o *M. tuberculosis*. Tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB), que teve seu primeiro caso notificado em 2006, é definida como resistência pelo menos à RMP e INH, uma Fluoroquinolona, e a algum dos três injetáveis de segunda linha do tratamento à doença (Amicacina, Capreomicina, ou Canamicina) (PRASAD, 2012). Além disso, há registros de Tuberculose totalmente resistente (TDR-TB) que é definido como aquela cepa que possui resistência *in vitro*, a todas as drogas de primeira e segunda linha do tratamento. Em janeiro de 2012, foram reportados em Mumbai, na Índia, 12 casos de Tuberculose totalmente resistente (WHO, 2012; ZARIR, 2011).

A porcentagem de pacientes contaminados por cepas resistentes aumentou a ponto de pôr em risco o controle da doença. O surgimento dessas cepas resistentes é preocupante, pois existem poucos fármacos efetivos contra esta forma da TB, o que tornaria a doença sem tratamento e cura (NAPOCA *et al.*, 2012). Em razão disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza que sejam desenvolvidos novos métodos diagnósticos, fármacos anti-tb mais efetivos e uma vacina mais eficaz. Por este motivo, o objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia de detecção rápida de resistência aos fármacos utilizados no tratamento da TB, elemento fundamental para os programas de controle da doença.

Tuberculose – Breve histórico

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa que matou e ainda mata milhares de pessoas ao redor do mundo. Considera-se que os membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* descendem de um mesmo ancestral de 15.000 a 20.000 anos (KAPUR *et al.*, 1994). Análises de DNA realizadas em múmias egípcias mostraram a que a doença acometia, além dos pulmões, formas extrapulmonares (DANIEL, 2006).

Aglomerados populacionais nas cidades europeias consequentes da revolução industrial, migração dos povos e aumento da pobreza proporcionaram condições

favoráveis para que a doença deixasse de ser endêmica para passar a ser epidêmica em meados do século XVI (DONOGHUE *et al.*, 2004).

Em 1882, a partir de experimentos utilizando amostras de escarro de pacientes com TB ativa, e os semeando em meios de cultura, o alemão Robert Koch identificou o agente causador da TB, *M. tuberculosis*. Em 1895, foi descoberto os raios-x, ferramenta extremamente importante para análise interna das condições pulmonares dos pacientes (PERKINS *et al.*, 2007).

Em 1906, Albert Calmette e Camille Guérin, em um trabalho desenvolvido no Instituto Pauster na França, utilizando cepas atenuadas de *Mycobacterium bovis*, desenvolveram a vacina BCG, que tem como objetivo imunizar crianças de até 13 anos contra as formas graves da doença (PEREIRA, 2007).

Em 1944, Waksman empregou pela primeira vez o medicamento estreptomicina (SM) no tratamento da doença, ocorrendo uma revolução favorável do tratamento e nos índices de cura, à curto prazo, da TB. Entretanto, sem o acompanhamento necessário ao tratamento e ao doente, surgiram bactérias resistentes a este medicamento (SOUZA *et al.*, 2006). O surgimento da resistência bacteriana levou ao desenvolvimento de vários esquemas terapêuticos com diferentes fármacos. O esquema I (rifampicina, isoniazida e pirazinamida), principal de 1979, teve, mais uma vez, grande impacto epidemiológico. Em 1993, a OMS declara a TB como emergência global (PEREIRA, 2007).

Epidemiologia

Na maioria das vezes, a tuberculose acomete os pulmões (85% dos casos), mas também pode atingir outros sítios extrapulmonares (WHO, 2011a). 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 vida (LOCHT *et al.*, 2007).

Segundo dados divulgados pela OMS, em 2010, houve a incidência de 9,4 milhões de casos de tuberculose no mundo (Figura 1). Destes, 5,4 milhões são de novos

casos, levando a morte mais de 1,3 milhões de pessoas em 2009. Países como Índia e China representam 40% do total de casos notificados (WHO, 2011b).

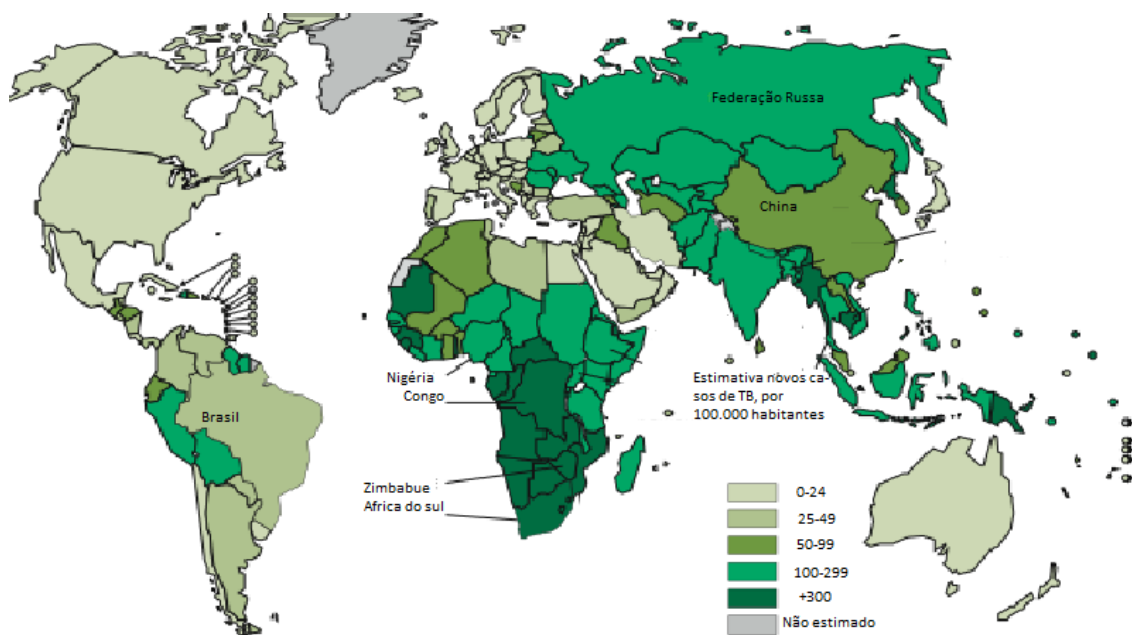


Figura 1. Estimativa da incidência de novos casos de TB em 2010 (Adaptado de WHO, 2011a).

O Brasil ocupa a 17^o posição entre os 22 países que são responsáveis por 80% da tuberculose mundial. A taxa de incidência em 2011 foi de (36/100.00) habitantes, o que significa uma queda 15,9% comparado a 2001. A taxa de mortalidade em 2010 foi de (2,4/100.00). Embora o Sudeste concentre o maior número de casos, a região norte apresentou as maiores taxas de incidência em todos os anos analisados. Em 2011, os estados do Amazonas (62,6/100.000) e Rio de Janeiro (57,6/100.000) apresentaram as maiores taxa de incidência do país (Figura 2) (BRASIL, 2012).

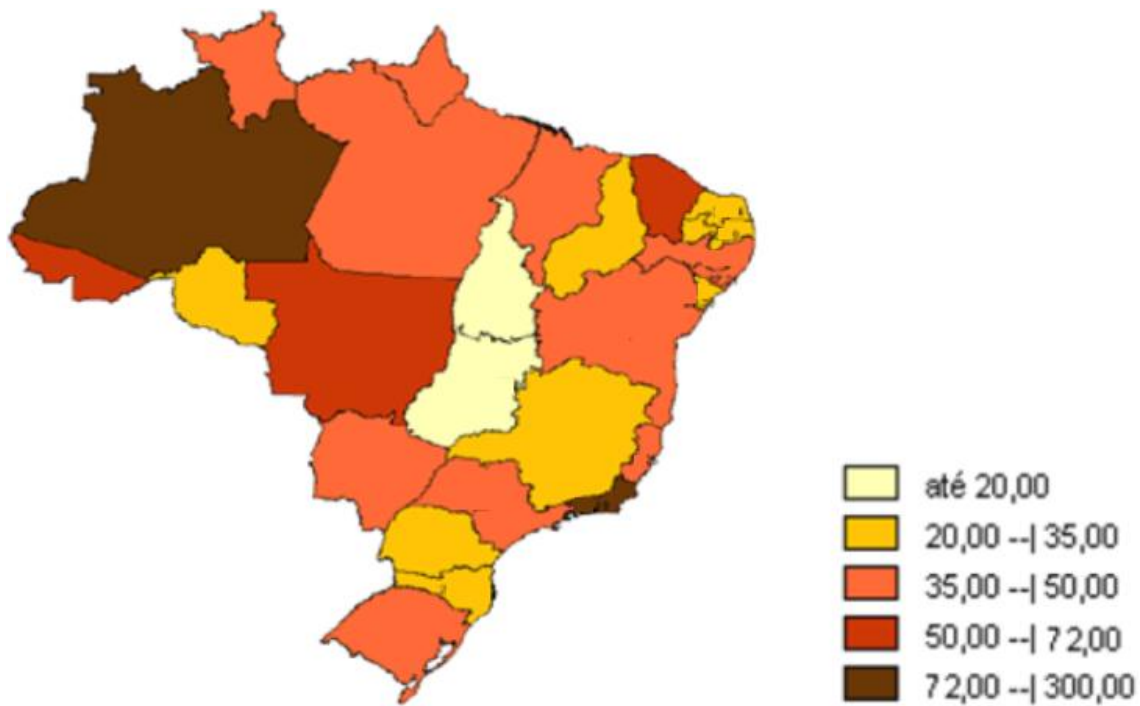


Figura 2. Incidência de casos de TB por estado brasileiro em 2011 (Adaptado de BRASIL, 2012).

No Rio Grande do Sul, foram notificados 6.529 casos em 2009. Entre 2001 e 2009, a incidência de TB passou de 41 para 46,1/100.000 habitantes. A taxa de coinfeção TB/HIV é o dobro do resto do país, resultando em 440 mortes por ano. Porto Alegre é a capital com a maior incidência de TB no Brasil, com 120/100.000 habitantes (Figura 3) (CEVS/RS, 2011)

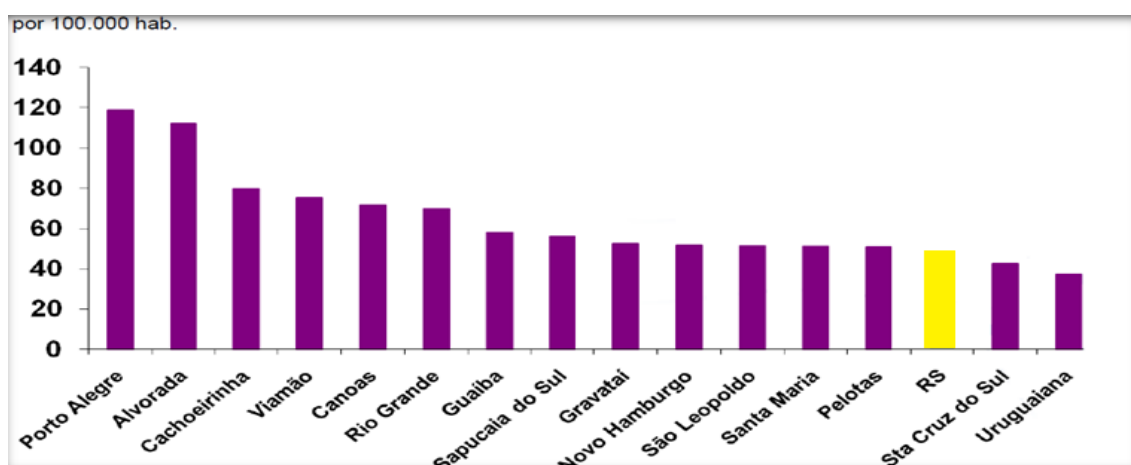


Figura 3. Incidência de TB nos municípios considerados prioritários, onde se concentram 68% dos casos de TB no Rio Grande do Sul (Adaptado de CEVS/RS, 2011).

Etiologia - *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis é a espécie-tipo do gênero *Mycobacterium* família *Mycobacteriaceae*, sub-ordem *Corynebacteriaceae*, ordem *Actinomycetales*. Pertence a um complexo constituído das seguintes espécies: *M.tuberculosis*, *M. Bovis*, *M. Africanum*, e o *M. microti* (SMITH *et al.*, 2009). É um bacilo reto ou ligeiramente curvo, imóvel, não esporulado, não encapsulado que mede de 1 a 10 µm de comprimento e 0,2 a 0,6 de largura. Caracteriza-se por ser álcool-ácido resistente, propriedade utilizada na coloração de Ziehl-Neelsen. A micobacteria sintetiza parede celular de baixa permeabilidade que contribui para sua resistência contra alguns agentes terapêuticos (BRENNAN, 1995).

O genoma completo da cepa H37Rv (Figura 5) de *M. tuberculosis* é composto de 4.411.529 pb e contém em torno de 4.000 genes. Possui um conteúdo rico em G + C (65,5%), o qual é refletido na composição dos aminoácidos e das proteínas. O conteúdo de G + C é constante em todo o genoma, indicando provável ausência de transferência horizontal de genes envolvidos com a patogenicidade (BRENNAN, 1995). Várias regiões mostram grande quantidade deste conteúdo, correspondendo a sequências pertencentes a grandes famílias gênicas, que incluem sequências polimórficas ricas em G + C (PGRSs). Uma característica importante de *M. tuberculosis* é a grande capacidade codificante do DNA ser direcionada à produção de enzimas envolvidas na lipólise (TM, 1994). Além de sequências genéticas IS6110, IS1081 e mpb70, características como a ausência de pigmentação das colônias, ausência de crescimento na presença de 500 g/ml p-nitrobenzoato (PNB) e 5% cloreto de sódio, catalase termoestável e arilsulfatas, ausência de crescimento a 45°C, permitem diferenciar os membros do complexo *M. tuberculosis* das outras micobactérias (MORITA *et al.*, 2004).

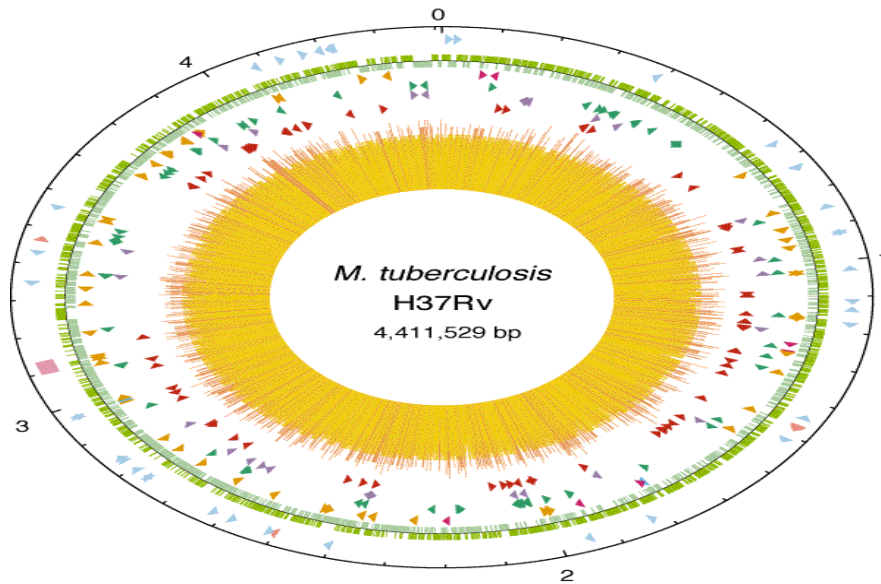


Figura 4. Mapa circular do cromossomo de *M. tuberculosis* H37Rv. O círculo externo mostra a escala em megabases, com o 0 representando a origem de replicação. O anel mais interno denota as posições dos genes de RNA estáveis (tRNAs são azuis e os outros em rosa) e uma região de repetições diretas - DRs (cubo rosa); o segundo anel demonstra a sequência codificante por fita (sentido horário, verde escuro; sentido anti-horário, verde claro); o terceiro anel retrata sequências de DNA repetidas (sequências de inserção, laranja; família REP 13E12, rosa escuro; prófagos, azul); o quarto anel mostra as posições dos membros da família PPE (verde); o quinto anel mostra os membros da família PE (roxo, excluindo PGRS); e o sexto anel mostra as posições das sequências PGRS (vermelho escuro). O histograma, no centro, representa o conteúdo de G+C, com <65% de G + C em amarelo e >65% de G + C em vermelho (Adaptado de DIJL *et al.*, 1998).

Mecanismos de transmissão da TB.

A TB é transmitida por via aérea, através de aerossóis de pacientes com a doença pulmonar ativa, expelidos ao tossir, espirrar ou falar. As gotículas mais pesadas se depositam rapidamente, enquanto as mais leves permanecem em suspensão no ar. Somente os núcleos secos das gotículas (núcleo de Wells) com diâmetros de até 5µm contendo 1 a 2 bacilos podem atingir os bronquíolos e alvéolos pulmonares e iniciarem a multiplicação (CAPONE, 2006). A bactéria da TB pode, às vezes, permanecer viva no ar por algumas horas, especialmente em lugares pequenos sem ar fresco, onde não há luz solar (MCGEE, 2005).

A possibilidade de uma pessoa ser infectada pelo bacilo da TB é inerente a diversos fatores como: A) características das fontes de infecção e seus contatos (pessoas que coabitam com o doente); B) a concentração de bacilos no ar, determinada pelo volume do ambiente e sua ventilação; C) a condição imune da pessoa exposta e o tempo

de exposição (BRASIL, 2010). Estas características fazem com que a TB tenha relação direta com a miséria e com a exclusão social. No Brasil, ela é uma doença que afeta, principalmente, as periferias urbanas ou aglomerados e geralmente está associada às más condições de moradia e de alimentação, à falta de saneamento básico, ao abuso de álcool, tabaco e de outras drogas. (BRASIL, 2002).

Infecção

Os estágios da doença ocorrem de duas diferentes maneiras. A primeira delas é chamada de TB latente, esta ocorre quando a pessoa está infectada com a bactéria da TB, no entanto, não se observa os sintomas da doença (DAVIS, 2011). Neste período, os bacilos se encontram em dormência metabólica, permanecendo no interior do macrófago com metabolismo muito reduzido, podendo sobreviver por anos, sem se manifestar (SMITH, 2003). O estado de dormência ou latência, no qual os bacilos permanecem dentro dos tecidos infectados, reflete uma redução acentuada da ação da resposta imune celular, que pode reprimir, mas não erradicar a infecção. Tal propriedade tem um importante significado clínico, já que a TB frequentemente representa a reativação de uma infecção antiga, subclínica, ocorrida há vários anos. Cerca de 90% dos pacientes que se infectam, não desenvolvem a doença, pois o bacilo é controlado pelo sistema imune (REECE; KAUFMANN, 2012).

O segundo estágio é chamado de doença ativa, onde a bactéria se reproduziu de forma suficiente para a pessoa manifestar a doença (WALZL *et al.*, 2011). Este estágio inicia no momento em que o bacilo entra no alvéolo e é fagocitado pelo macrófago alveolar e células dendríticas residentes. Os bacilos que não morrem por ação lisossomal se multiplicam no interior desses macrófagos. As células dendríticas, por sua vez, os carregam pelas vias distais dos linfonodos mediastinais, que irão se deparar com os mediadores imunológicos ativados pelos macrófagos como o Interferon Gama (INF- γ) secretados por célula *natural killer* (NK) e células T (KORBEL *et al.*, 2008) (PIETERS, 2008). Linfócitos e macrófagos migram do sítio primário da infecção para formar o granuloma, o qual consiste em uma área central contendo macrófagos infectados e células gigantes, sendo circundado por células T e B. Os macrófagos uma vez infectados podem se instalar nos pulmões ou disseminar-se para outros órgãos do corpo (LIN, 2012).

Tratamento

A TB é uma doença curável em mais de 90% dos casos novos, sensíveis aos medicamentos anti-TB (THE *et al.*, 2001) desde que obedecidos os princípios básicos da terapia medicamentosa e a sua adequada operacionalização (ESCHROEDER, 2010). No Brasil, o tratamento para TB é feito, obrigatoriamente, na rede pública de saúde e os fármacos são fornecidos gratuitamente pelo Ministério da Saúde (CASTELO *et al.*, 2004).

Para efeito de indicação de esquemas terapêuticos, considera-se os critérios apresentados na tabela 1:

Tabela 1. Definições para fins de aplicação de esquemas terapêuticos (Adaptado de BRASIL, 2010).

| | |
|---|--|
| Caso novo ou virgens de tratamento (VT) | Pacientes que nunca se submeteram ao tratamento anti-TB, ou o fizeram por até 30 dias. |
| Retratamento ou com tratamento anterior (TA) | Pacientes já tratados para TB por mais de 30 dias, que venham a necessitar de novo tratamento por recidiva após cura (RC) ou retorno após abandono (RA). |
| Falência | Persistência da positividade do escarro ao final do tratamento. São também classificados como casos de falência os casos que, no início do tratamento, são fortemente positivos (++ ou ++++) e mantêm essa situação até o 4º mês, ou aqueles com positividade inicial seguida de negatificação, e nova positividade por dois meses consecutivos, a partir do 4º mês de tratamento. |

O paciente que retorna ao sistema após abandono deve ter sua doença confirmada por nova investigação diagnóstica por baciloscopia, devendo ser solicitada cultura e teste de sensibilidade, antes da reintrodução do tratamento anti-TB básico.

Em 1979, o Brasil preconizou um sistema de tratamento para a TB composto pelo esquema I (2RHZ/4RH) para os casos novos; Esquema I reforçado (2RHZE/4RHE) para retratamentos; Esquema II (2RHZ/7RH) para a forma meningoencefálica; e Esquema III (3SZEet/9EEt) para falência. Em 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, reviu os sistemas de tratamento da TB no Brasil introduzindo o etambutol (BEM) como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do esquema básico. A apresentação farmacológica deste esquema passa a ser em comprimidos de doses fixas combinadas dos quatro medicamentos (RHZE), conforme (TABELA 2) (BRASIL, 2010).

Tabela 2. Esquema medicamentoso (esquema I) para o tratamento de TB.

| Regime | Fármacos | Faixa de peso | Dose/diária | Meses |
|---|-----------------------------------|----------------------|-------------------------------|--------------|
| 2 RHZE Fase intensiva | RHZE | 20 a 35 kg | 2 comprimidos | 2 |
| | 150/75/400/275 mg | 36 a 50 Kg | 3 comprimidos | |
| | Comprimido em dose fixa combinada | > 50 kg | 4 comprimidos | |
| 4RH Fase de manutenção | RH | 20 a 35 kg | 1 comp. ou cápsula 300/200 mg | 4 |
| | 300/200 ou 150/100 mg | 36 a 50 kg | 1 comp. Ou cápsula 300/200 mg | |
| | Comprimido ou cápsula | > 50 kg | 2 comp ou cápsula 300/200 mg | |

Existem mais de 20 drogas utilizadas no tratamento da TB, elas são usadas em diferentes combinações e em diferentes circunstâncias. Algumas drogas são utilizadas somente em novos casos, onde não há suspeita de resistência a nem uma droga, enquanto outras são usadas somente para o tratamento de cepas resistentes (WHO, 2011a)

Embora a vacina BCG forneça proteção efetiva em crianças quando administrada no período neonatal, a proteção não ocorre contra formas da TB em adultos, devido a razões ainda pouco esclarecidas (LAURA *et al.*, 2007). Além disso, um elevado número de complicações pode ocorrer, como reações locais adversas, linfadenites e infecção disseminada em crianças imunocomprometidas (BUKHARI, 2012).

Tratamento MDR-TB

O tratamento da MDR-TB é difícil, caro e desafiador. Idealmente, o tratamento deve ser feito sob a supervisão de um médico experiente em lidar com esses casos, uma vez que, este tratamento representa aos pacientes a última chance de cura (NAPOCA; DANIELLO, 2012). O tempo de duração varia entre 18 e 24 meses, na dependência da curva de negatificação bacteriológica e também da evolução clínica e radiológica do indivíduo. Pacientes que apresentem baciloscopia e/ou cultura positiva no 6º mês deverão completar 24 meses de tratamento. O prognóstico para as multi resistência é ruim, onde 80% dos pacientes morrem dentro de quatro meses após o diagnóstico (WHO, 2008a).

O Brasil optou, mais uma vez, pela estratégia de tratamento padronizado nestes casos (**Tabela 3**), pois existem dificuldades na interpretação dos testes de sensibilidade para alguns medicamentos de primeira e segunda linha. Tratamentos individualizados poderão ser utilizados em casos especiais de acordo com a avaliação de profissional experiente no manejo dos esquemas de MDR (BRASIL, 2010).

Tabela 3. Esquema padronizado de tratamento para pacientes confirmado com MDR-TB (Adaptado de BRASIL, 2010).

| Doses por faixa de peso | | | | | |
|-----------------------------------|----------------|--------------|-------------------|-----------------|-----------|
| Regime | Fármaco | Até 20 KG | 36 A 50Kg | Mais 50 Kg | Meses |
| 2S5ELZT - Fase intensiva | Estreptomicina | 20 mg/Kg/dia | 750 - 100 mg/dia | 1.000 mg/dia | 2 |
| | Etmabutol | 25 mg/Kg/dia | 800 - 1200 mg/dia | 1.200 mg/dia | |
| | Levofloxacina | 10 mg/Kg/dia | 750 mg/dia | 750 mg/dia | |
| | Pirazinamida | 35 mg/Kg/dia | 1.500 mg/dia | 1500 mg/dia | |
| | Terizidona | 20 mg/Kg/dia | 750 mg/dia | 750-1000 mg/dia | |
| 4S3ELZT - Fase intensiva | Estreptomicina | 20 mg/Kg/dia | 750 - 100 mg/dia | 1.000 mg/dia | 4 |
| | Etmabutol | 25 mg/Kg/dia | 800 - 1200 mg/dia | 1.200 mg/dia | |
| | Levofloxacina | 10 mg/Kg/dia | 750 mg/dia | 750 mg/dia | |
| | Pirazinamida | 35 mg/Kg/dia | 1.500 mg/dia | 1500 mg/dia | |
| | Terizidona | 20 mg/Kg/dia | 750 mg/dia | 750-1000 mg/dia | |
| 12ELT - Fase de manutenção | Etmabutol | 25 mg/Kg/dia | 800 - 1200 mg/dia | 1.200 mg/dia | 12 |
| | Levofloxacina | 10 mg/Kg/dia | 750 mg/dia | 750 mg/dia | |
| | Levofloxacina | 25 mg/Kg/dia | 500-750 mg/dia | 750-1000 mg/dia | |

Tuberculose e HIV

A epidemia do HIV tem levado ao aumento da incidência global da tuberculose inclusive as formas multirresistentes da doença. A coinfeção de TB e HIV dificulta muito o tratamento e o diagnóstico da doença. Além disso, é um alarme para falhas inerentes aos programas de controle da doença (MAYER, 2010).

Dos 9 milhões de casos de TB ocorridos em 2007 estima-se que, aproximadamente, 15% ocorreram em pacientes HIV positivos. Em algumas regiões da África, os índices de coinfeção podem chegar a 80% (WHO, 2009). Na cidade de KwaZulu-Natal, sul da África, há registro da morte de 52 pacientes dentre 53 que estavam coinfectados com XDR-TB e HIV e nestes casos, o tempo de vida não passou de 16 dias após a data do (GANDHI *et al.*, 2006).

Uma estimativa global aponta que, em 2008, aproximadamente 33 milhões de pessoas estavam vivendo com o vírus HIV. (SUCHINDRAN *et al.*, 2009). O risco de reativação da TB é de 10% durante toda a vida para pacientes saudáveis. Por outro lado, pacientes coinfectados pelo vírus aumentam este risco para 10% ao ano (PETER A, *et al.*, 1992).

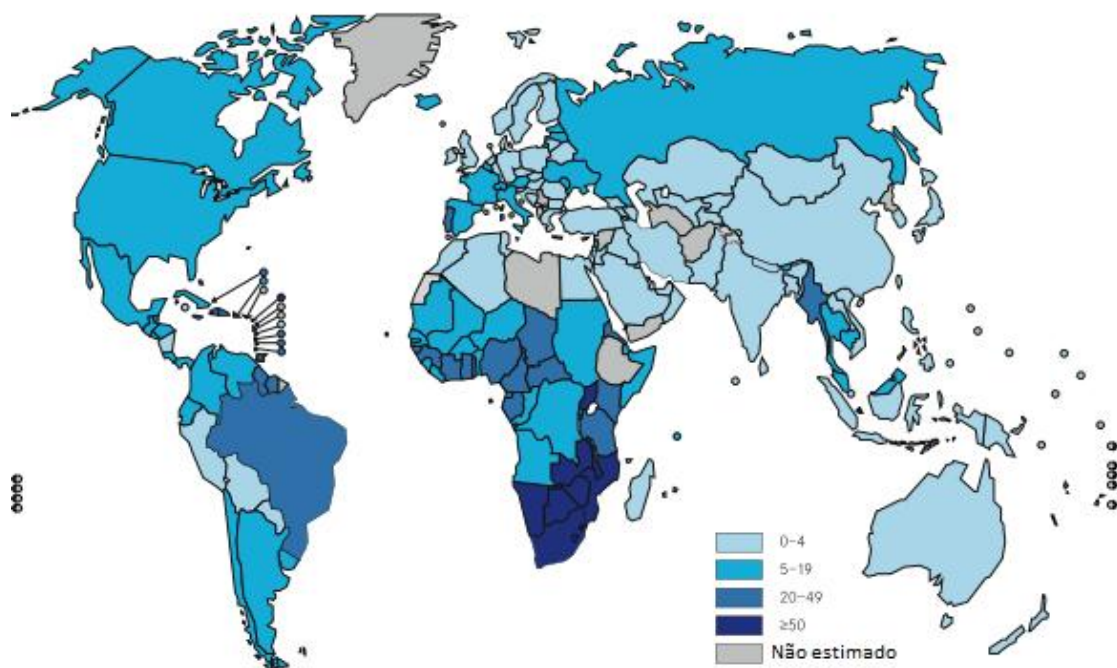


FIGURA 5. Estimativa da prevalência de HIV entre os casos novos de TB (Adaptado de PADMAPRIYADARSINI *et al.*, 2011).

No Brasil, em 2010, entre os casos novos de TB, cerca de 10% apresentavam coinfeção TB/HIV. A região sul do país possui o maior percentual de coinfeção (18,6%), quase duas vezes superior à média nacional. Os estados de Santa Catarina (21,1%) e Rio Grande do Sul (20,6%) apresentam as maiores taxas. Esse indicador está intimamente relacionado à realização do exame anti-HIV para pacientes com suspeita de tuberculose. A TB representa a primeira causa de morte em pacientes com AIDS no Brasil (BRASIL, 2012).

RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS

Definições para a resistência

De acordo com o protocolo do II Inquérito Nacional de Resistência a Drogas em Tuberculose no Brasil, a **Resistência primária** é definida como a presença de organismos resistentes a uma ou mais drogas em pacientes que nunca foram tratados para TB ou que foram tratados por menos de um mês. A **Resistência adquirida** é definida como a presença de organismos resistentes a uma ou mais drogas em pacientes

tratados para TB por um mês ou mais, sendo que estão inclusos os casos de recidiva, de retorno após abandono e de falência de tratamento (BRASIL, 2010).

Resistência

Resistência a drogas anti-TB pode ocorrer devido a mutações espontâneas, ou resultantes de pressão sofrida por antibióticos tanto em genes codificantes quanto no alvo da droga ou enzima envolvida na ativação do fármaco. Os índices de mutação variam entre as diferentes drogas conforme a tabela 4 (SYRE *et al.*, 2009).

Tabela 4. Índice de resistência natural de *Mycobacterium tuberculosis* frente a cada fármaco (Adaptado de BRASIL, 2008).

| Medicamento | Concentração em meio de Löwenstein-Jensen (µg/ml) | Resistência natural |
|----------------|---|--|
| Rifampicina | 40 | 1 mutante resistente a cada 10^{1-8} bacilos |
| Isoniazida | 0,2 | 1 mutante resistente a cada 10^{3-6} bacilos |
| Etambutol | 2 | 1 mutante resistente a cada 10^{3-6} bacilos |
| Estreptomicina | 4 | 1 mutante resistente a cada 10^{3-6} bacilos |
| Etionamida | 20 | 1 mutante resistente a cada 10^{3-6} bacilos |
| Pirazinamida | 25 | 1 mutante resistente a cada 10^{2-4} bacilos |

Além disso, prescrições inadequadas de medicamentos, falha no tratamento anterior, não adesão ao tratamento, baixa qualidade das drogas, diagnóstico tardio, má absorção da droga e intolerância medicamentosa, podem promover o desenvolvimento da resistência (SYRE *et al.*, 2009) conforme esquema apresentado na Figura 6.

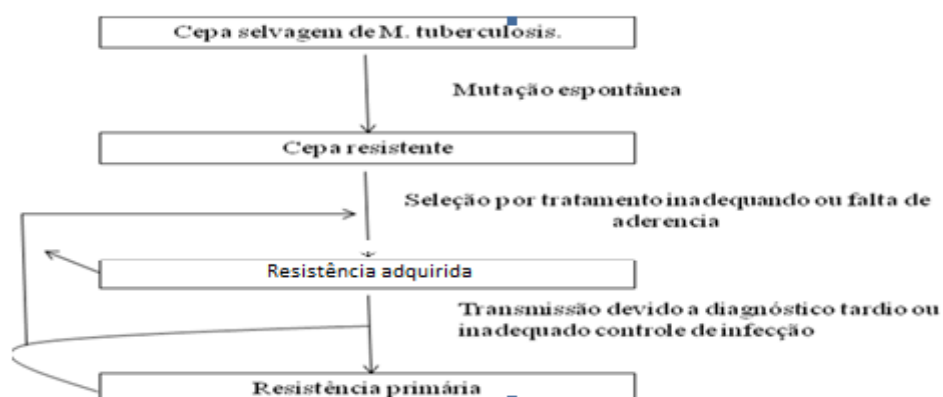


Figura 6. Esquema do desenvolvimento de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* (Adaptado de ZHANG *et al.*, 2009).

Multidroga resistência (MDR)

Em 2010, foram notificados 650 mil casos de MDR-TB no mundo e estima-se que 9% destes casos são XDR-TB. Nos 27 países com altas cargas de MDR-TB, somente 1% dos novos casos e 3% dos casos previamente tratados, são confirmados por laboratórios habilitados. Estima-se que menos de 7% dos casos de MDR-TB são diagnosticados ao redor do mundo e, destes, somente 1% dos pacientes recebem tratamento apropriado (WHO, 2011c).

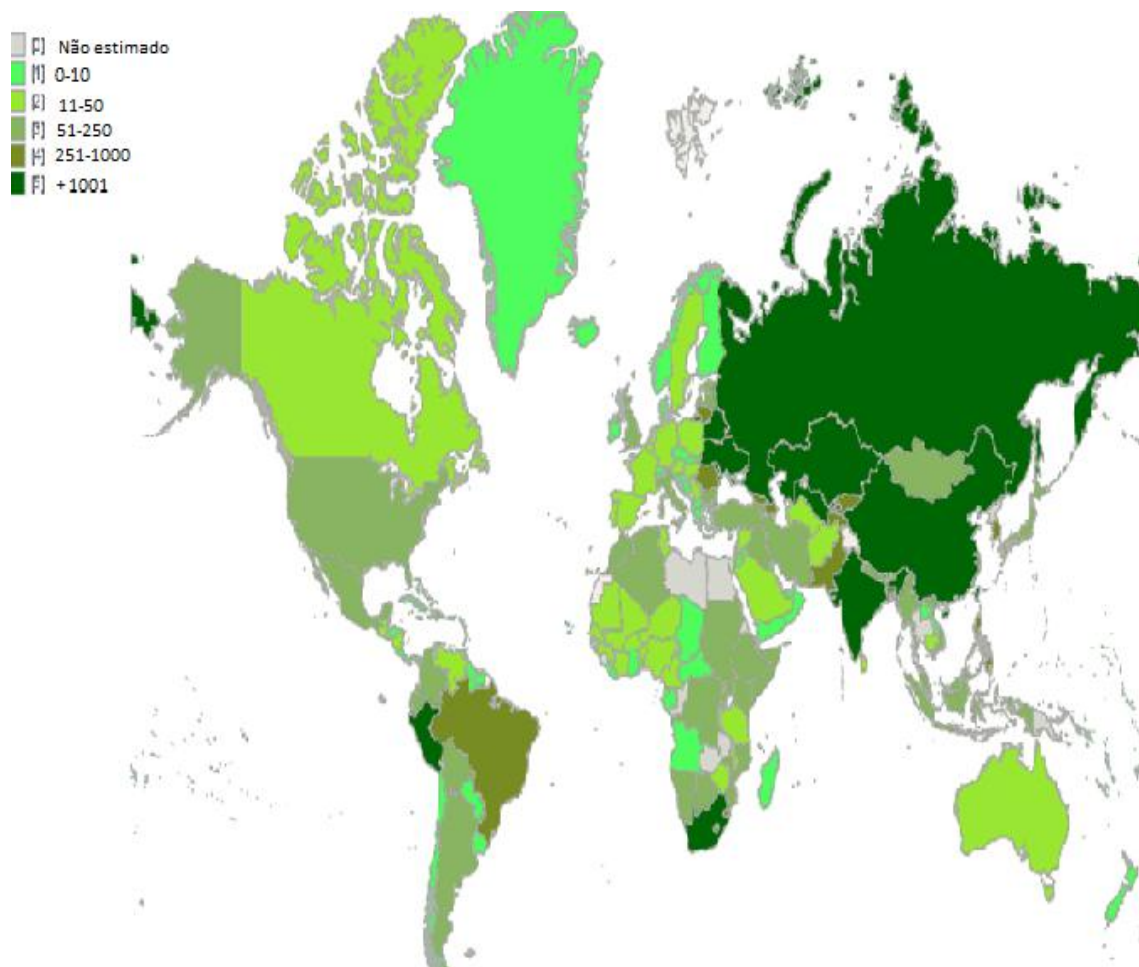


Figura 7. Notificação mundial absoluta de MDR-TB, por 100 mil habitantes, em 2010 (Adaptado de WHO, 2011a).

Controle da tuberculose no Brasil

A resposta brasileira na luta contra a TB foi inserida na sociedade em 1927 com a criação das ligas contra a tuberculose, que visavam duas linhas de ação: Uma preventiva e a outra voltada para o tratamento. Neste período dá-se início ao uso da vacina BCG (HIJJAR, 2007).

O Brasil, por intermédio de programas nacionais, busca realizar o diagnóstico (baciloscopia) e a terapia (os regimes de curta duração) como ferramentas para o controle da TB. Devido à ingerência das redes de TB, descomprometimento político e uma série de outros parâmetros socioculturais, o panorama geral da TB no Brasil e no mundo continua a passos lentos (WHO, 2012).

Lançada pela OMS em 1990, a estratégia DOTS (*Directly Observed Treatment Short Course*) tornou-se prioridade no Brasil há pelo menos cinco anos, tendo como objetivo cinco medidas essenciais: (a) compromisso político e suporte financeiro (b) provimento adequado e regular de medicamentos, com controle de qualidade dos fármacos; (c) detecção precoce de casos, com bacteriologia de boa qualidade (d) esquemas de tratamento padronizados e aplicados sob observação direta aos pacientes, com objetivo de assegurar a regularidade na adesão a terapia; (e) monitoramento e avaliação do sistema de informação e impacto das medidas adotadas. A estratégia DOTS foi adotada em pelo menos 150 países (RAVIGLIONE *et al.*, 2002).

MECANISMO DE AÇÃO E RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ANTI-TB

O surgimento de resistência em isolados de *M. tuberculosis* vem ocorrendo desde a introdução dos medicamentos anti-TB no tratamento. Sendo da pressão seletiva exercida pelo uso dos fármacos sobre a população de bacilos, que apresentam taxas de mutações espontaneamente inerentes ao uso de cada medicamento (SEKIGUCHI, 2007; CANGELOSI, 1999). Mecanismos moleculares da resistência às drogas têm sido elucidados, ficando clara a associação da resistência a mutações pontuais, deleções ou inserções no genoma de *M. tuberculosis* (CHO *et al.*, 2009).

Isoniazida (INH)

Introduzida em 1952, a INH é uma das drogas de primeira linha mais efetivas contra a TB, sendo eficaz frente aos bacilos em replicação ativa. Consiste em um anel de piridina e um grupo hidrazida, INH é um análogo de nicotinamida, (figura 8). (ROBITZEK *et al.*, 1952).

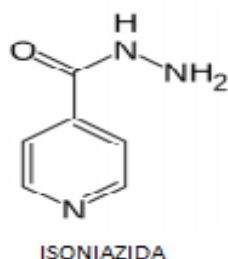


FIGURA 8. Ilustração da estrutura molecular da Isoniazida (Adaptado de ROBITZEK, 1952).

A INH é uma pró-droga que requer ação de uma enzima endógena da micobactéria, a catalase peroxidase (*katG*) (ZHANG *et al.*, 2009). A toxicidade da INH resulta de uma reação peroxidativa catalisada por esta enzima, agindo sobre a síntese dos ácidos micólicos da parede celular, onde, pelo menos duas enzimas, enoil-ACP redutase (*InhA*) e cetoacil ACP sintetase (*KasA*) têm sido identificadas como alvo da inibição pela INH (COLL *et al.*, 2005).

A resistência à INH é a segunda forma mais comum de monorresistência no Brasil, ficando atrás apenas da estreptomicina (CARDOSO *et al.*, 2004). Mutações em diferentes genes como *katG*, *inhA*, *kasA*, *ahpC* e *oxyR*, podem levar a ocorrência de cepas resistentes. Mutação no gene *katG*, mais especificamente no códon 315 (Ser → Thr) é mais frequente ocorrendo de 60 a 90% dos casos da resistência a esta. (SIQUEIRA *et al.*, 2009; SLAYDEN *et al.*, 2000; VILCH *et al.*, 2007). Mutações pontuais, deleções ou inserções neste gene podem levar a perda parcial ou total da atividade da catalase peroxidase, enzima indispensável para a ativação do fármaco (CAMPBELL *et al.*, 2011). A resistência a INH pode também surgir a partir de mutações na região regulatória C (-15) T do gene *inhA*, ocorrendo entre 20 a 35% dos casos. Mutação nesta região promotora normalmente confere baixo nível de resistência

(MIC = 0,2-1 mg / L). Alterações no gene *kasA*, que codifica uma enzima relacionada com a síntese de lipídeos, também tem sido encontradas em cepas resistentes a INH (KARAKOUSIS, 2009). Aproximadamente 20% das cepas resistentes à INH não possuem nenhum tipo de mutação, o que indica que ocorra outros mecanismos de resistência, como as bombas de efluxo, que são capazes de retirar as drogas de dentro da célula, e permeabilidade da membrana (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Rifampicina (RMP)

A RMP é uma ansamicina lipofílica de amplo espectro da família das rifamicinas (Figura 9). A incorporação da RMP ao esquema de tratamento anti-TB, permitiu a redução do tempo de tratamento de 18 para 6 meses. São considerados os fármacos esterilizantes mais efetivos disponíveis na quimioterapia da doença (GROSSET *et al.*, 1998).

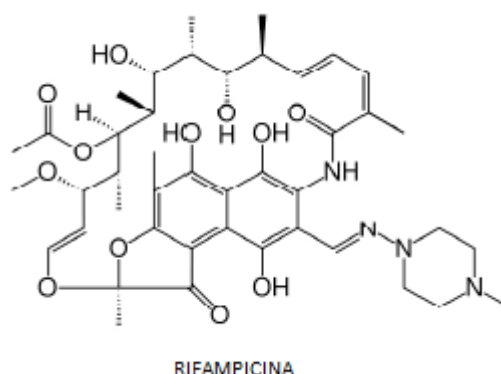


FIGURA 9. Ilustração da estrutura molecular da Rifampicina (Adaptado de MITCHISON, 1985).

Devido à conformação de seus anéis aromáticos, a RMP se difunde facilmente através do envelope hidrofóbico da membrana. Atua ligando-se à subunidade beta da enzima RNA polimerase, bloqueando a transcrição (ZHANG *et al.*, 2011; UNIT *et al.*, 1998).

Mutações espontâneas em cepas RMP resistentes ocorrem com uma frequência aproximada de 10^8 . Cerca de 95% destas mutações estão contidas em 4 regiões (N-terminal cluster e cluster I e II e III da subunidade Beta (GILL *et al.*, 2011). Em,

aproximadamente, 90% dos isolados clínicos resistentes a RMP as mutações ocorrem em uma sítio chamado RDRR (região determinante de resistência a rifampicina), de 81 pb, localizada entre o códon 507 e 533 do gene *rpoB*, sendo no códon 531 (Ser), (526) (His) e 516 (ASP) onde ocorrem 86% das mutações nesta região (ROUSE *et al.*, 2003; IGOR *et al.*, 2007; MCCAMMON *et al.*, 2005).

Isolados resistente a esta droga são em 95 a 98% das vezes resistentes também a INH (WATTERSON *et al.*, 1998). Desta forma, resistência a RMP é um indicador confiável para caso de MDR-TB. Estima-se que uma pequena porcentagem de isolados RMP resistentes (<5%) não possuem mutações no gene *rpoB*, o que sugere que ocorra mecanismos alternativos incluindo permeabilidade ou mutações em outras subunidades da RNA polimerase (SRIVASTAVA *et al.*, 2004; HEEP *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2012).

Pirazinamida (PZA)

Descoberta em 1952, a PZA (Figura 10) possui uma importante atividade esterilizante, embora seja menos bactericida do que a RMP e INH (WADE *et al.*, 2003)

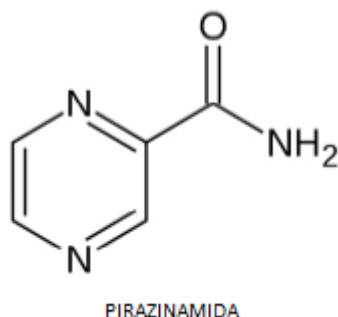


FIGURA 10. Ilustração da estrutura molecular da pirazinamida (Adaptado de YEAGER, 1952).

A PZA é de suma importância no tratamento, pois tem habilidade única de atacar a população de bacilos que está em dormência metabólica nos sítios acidificados dos pulmões, local que outras drogas não. PZA é uma pró-droga semelhante à INH, que requer ativação por um ácido pirazinoico (POA) da enzima pirazinamidase (PZase), sendo ativo apenas em pH ácido (5,5) (SCORPIO *et al.*, 1997). O fármaco entra no bacilo por difusão passiva e é convertido pela PZase em POA que, então, sai da célula

através de difusão passiva por um mecanismo deficiente de efluxo (JOHN, 2000). A acumulação de POA é aumentada quando o pH extracelular é ácido. A atividade anti-TB é atribuída a mecanismos essenciais de transporte através da membrana (ZHANG *et al.*, 2009).

A resistência à PZA tem sido atribuída inicialmente por mutações no gene *pncA*, que codifica a PZase, e resulta na diminuição da atividade da enzima. De 72 a 97% das cepas resistentes possuem mutações em regiões específicas de 561 pb do gene ou em 82 pb da região promotora deste gene (HANG *et al.*, 2009).

Etambutol (EMB)

O etambutol (Figura 11) (*EMB dextro-2,2-(ethylenediimino)-di-1-butanol*) foi inicialmente utilizado em 1961 e junto com PZA, INH e RMP, representam os fármacos de primeira linha (Esquema I) no combate a TB. A concentração mínima inibitória do EMB é de 0,5 a 2,0 ug/ml (TAKAYAMA; KILBURN, 1989).

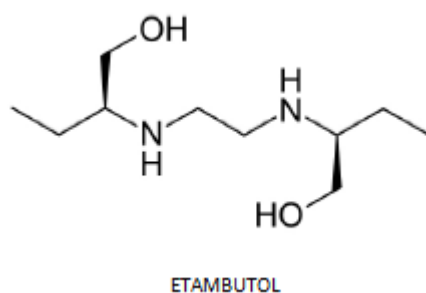


FIGURA 11. Estrutura molecular do Etambutol (Adaptado de MIKUSOVA *et al.*, 1995).

É um agente bacteriostático que age apenas contra bacilos em crescimento. A primeira via de ataque do EMB é a biossíntese do arabinogalactano através da inibição da parede celular de arabinomanano (importantes sacarídeos da parede celular micobacteriana). Além disso, age no metabolismo do RNA, transferência dos ácidos micólicos da parede celular e síntese de fosfolipídios (TAKAYAMA *et al.*, 1979; LEE. *et al.*, 2004).

A resistência ao EMB é usualmente associada com mutações pontuais no operon *embCAB*, que está envolvido na síntese do lipoarabinomanan e a outros componentes da parede celular. Esta mutação está presente em mais de 65% das cepas associada com altos níveis de resistência. Outros mecanismos devem ser considerados, uma vez que, cerca de um quarto das cepas não apresentam mutações neste gene (ZHANG *et al.*, 2003).

DIAGNÓSTICO:

O diagnóstico precoce da doença, além de ser vital, é prioridade para os programas de controle da TB. Os métodos convencionais hoje disponíveis são lentos, com resultados que podem levar semanas, além de, possuírem sensibilidade variável, principalmente em amostras paucibacilares e pacientes coinfectados com o vírus do HIV (SIMONNET, 2011). O diagnóstico rápido e preciso é o ponto de partida para a iniciação adequada de tratamento e, conseqüentemente, evitar o desenvolvimento de cepas resistentes e disseminação da doença (PIERSIMONI; SCARPARO, 2003).

Baciloscopia

Na maioria dos países com elevada prevalência da doença, o diagnóstico da TB ativa inicia-se com a realização da anamnese do paciente, seguido pela identificação do bacilo através de microscopia óptica, utilizando a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen. Embora a baciloscopia seja o método prioritário por ser de baixo custo, rápido e de fácil realização, possui sensibilidade extremamente variável (22 a 78%). A contagem é realizada, e o resultado se da através de uma escala padronizada pela OMS (**Tabela 5**). (CATTAMANCHI *et al.*, 2006; KAREN STEINGART, 2006).

| Número de bacilos observados na lâmina | Resultado |
|--|-----------|
| 0 | Negativo |
| 1-9/100 campos | Nº exato |
| 10-99/100 campos | 1+ |
| 1-10/campo | 2+ |
| > 10/campo | 3+ |

Tabela 5. Escala quantitativa para contagem de bacilos (em cruces), segundo a Organização Mundial da Saúde (BRASIL, 2008).

Cultura para micobactéria

A cultura permite a multiplicação e o isolamento dos bacilos a partir da semeadura de diversos tipos de amostras clínicas. Esta técnica é extremamente laboriosa e requer incubação a 37°C por 3 a 8 semanas ou mais. Este período de incubação é devido às próprias características de replicação do bacilo que é de crescimento lento. Só então, as colônias estarão suficientemente crescidas para os testes bioquímicos de identificação, assim como, a realização de técnicas moleculares (FATTORINI *et al.*, 2008). O meio mais utilizado é o Lowenstein-Jensen (LJ) (HONSCHA *et al.*, 2008), (Figuras 12 e 13). Este método é mais sensível e específico que a baciloscopia, sendo capaz de identificar o bacilo em uma concentração de 10² por mL de amostra. Em geral, a sensibilidade da cultura é de 80-85% e a especificidade é de, aproximadamente, 98% (TENOVER *et al.*, 1993). A contagem das colônias segue as recomendações da OMS, conforme Tabela 6.

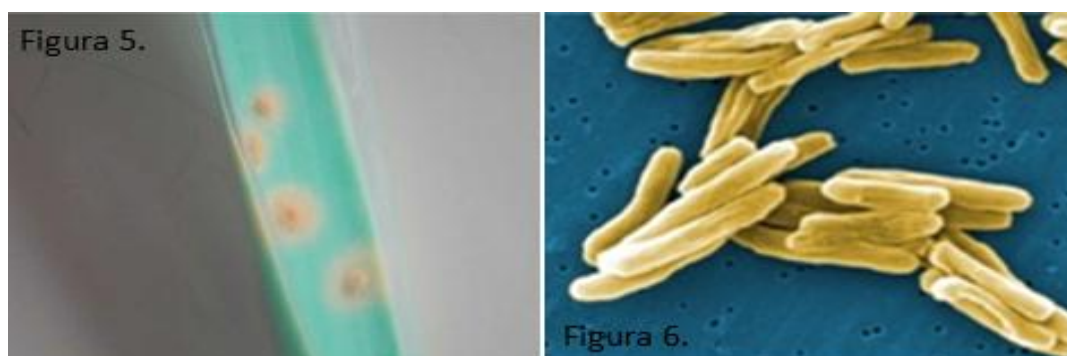


Figura 12. Colônias de *M. tuberculosis* em meio Ogawa Kudoh **Figura 13.** *M. tuberculosis* vista em eletromicrografia (Adaptado de BRASIL, 2010).

Tabela 6: Critérios para leitura e interpretação da cultura em meio sólido (Adaptado de BRASIL, 2008).

| Leitura | Resultado |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| Sem crescimento | Negativo |
| Menos de 20 colônias | Positivo – número exato de colônias |
| 20 a 100 colônias | Positivo + |
| Mais de 100 colônias separadas | Positivo ++ |
| Colônias confluentes (incontáveis) | Positivo +++ |

MÉTODOS PARA DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA

Metodologias fenotípicas

Teste de Suscetibilidade O teste de suscetibilidade (TS) é o exame laboratorial realizado para detectar a resistência/sensibilidade dos isolados de *M. tuberculosis* às drogas utilizadas no tratamento da doença (WHO, 1997). Para a realização deste teste, colônias previamente crescidas em meio sólido são repicadas em outro meio de crescimento contendo apenas uma concentração da droga. Desta forma, há a possibilidade de estimar a proporção de bacilos resistentes, contidos em uma amostra frente a uma concentração da droga (concentração crítica). Para cada droga foi definida uma proporção de mutantes resistentes em uma população bacilar, igual ou acima da qual a amostra é considerada resistente (proporção crítica) (BRASIL, 2008). (Tabela 7)

Tabela 7. Concentração crítica e proporção crítica, para cada droga que irá definir *in vitro* se o isolado é sensível ou resistente (CASTELO *et al.*, 2004).

| Drogas | Concentração Crítica (ug/ml) | Proporção Crítica(%) |
|---------------------|------------------------------|----------------------|
| ISONIAZIDA (INH) | 0,2 | 1 |
| RIFAMPICINA (RMP) | 40 | 1 |
| ETAMBUTOL (EMB) | 2 | 1 |
| ESTREPTOMICINA (SM) | 4 | 1 |

Se houver crescimento das colônias classifica-se a bactéria como resistente, caso não haja crescimento classifica-se como sensível. Esta metodologia é essencial para o diagnóstico de resistência às drogas. No entanto, possui algumas limitações, principalmente em relação ao longo período para obtenção de um laudo (WHO, 2011a).

Sabe-se que mecanismos moleculares de resistência podem fazer estas definições imprecisas, uma vez que, concentrações das drogas utilizadas para definição de resistência *in vitro* pode não ser a mesma concentração da droga no sítio de infecção *in vivo* (RAMASWAMY *et al.*, 1998). Além disso, testes utilizando as mesmas cepas em diferentes laboratórios obtiveram resultados distintos, sinalizando um problema

quanto à padronização desta técnica (JA., 2005). Segundo a OMS até 2015 todos os casos de retratamento deveriam realizar teste de suscetibilidade para a primeira linha de fármacos anti-TB, no entanto, em 2011 menos de 2% destes casos tiveram a análise de suscetibilidade às drogas realizada (PALOMINO, 2007).

Microscopic observation broth-drug susceptibility assay (MODS): Este método tem sido descrito para identificação precoce de crescimento do bacilo em meio líquido. É baseado na observação, através de microscopia invertida, do fator corda, que é uma das características de crescimento de *M. tuberculosis* (CAVIEDES *et al.*, 2000).

Nitrato redutase: Este método é baseado na capacidade de *M. tuberculosis* reduzir nitrato em nitrito pela ação da enzima nitrato redutase, na qual é indicado, pelo desenvolvimento da coloração rosa após adição de reagentes em meio de cultura (PRAKASH *et al.*, 2009)

Colorimetric Redox Indicator Method (REMA): Este método baseia-se na capacidade das bactérias metabolizarem ativamente a redução de resuzarina produzindo uma mudança de azul para rosa. O nível de redução é realizado através de uma microtitulação, da resuzarina (MARTIN *et al.*, 2006).

Concentração mínima inibitória (CMI): Metodologia quantitativa da concentração inibitória mínima (MIC) da droga é realizada em microplacas utilizando meio líquido a base de meio 7H9, onde a visualização do resultado se dá através da utilização de um corante que pode ser Alamar *blue* ou MTT (BLACKMAN *et al.*, 2012).

Método de detecção de microcolônias *Thin Layer*: Metodologia que utiliza meio sólido a base de Agar (7H11) em placas de Petry, onde é inoculada amostra clínica. Depois de 10 dias as microcolônias são observadas no microscópio comum (ACCEPTS *et al.*, 2009).

Os sistemas automatizados de cultura líquida foram desenvolvidos como alternativa ao sistema convencional em meio sólido. Estes sistemas detectam de diferentes formas o crescimento de *M. tuberculosis*, Seja através da produção de dióxido de carbono ou consumo de oxigênio com sensores radiométricos como o BACTEC 460 TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems) (DEUN *et al.*, 2009). A partir

de sensores fluorescentes, que detectam o crescimento do bacilo em meio 7H9, enriquecido com uma mistura de ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube [MGIT] 960; Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems) (KONTOS *et al.*, 2003; WILLIAMS-BOUYER *et al.*, 2000; ANEK-VORAPONG *et al.*, 2010)

7.2 Métodos genotípicos

Novas tecnologias tem sido propostas para agilizar o diagnóstico da TB, incluindo métodos genotípicos. Este tipo de metodologia procura identificar os casos resistência através de rastreamento de genótipos específicos, característicos de resistência (SURVEILLANCE, 2000). Estas técnicas possuem vantagens por obter os resultados mais rapidamente e, em algumas vezes, não necessitar esperar o crescimento dos microrganismos (SILAIGWANA *et al.*, 2012).

Em meados dos anos 90, a primeira metodologia molecular desenvolvida foi um método *in house* que tinha como alvo de amplificação uma sequência de inserção (IS6110) presente em múltiplas cópias ao longo do genoma da bactéria. Com a revogação da patente da PCR, diversas metodologias começaram a ser desenvolvida com o passar dos anos (SAIKI *et al.*, 1985; VITORIA *et al.*, 1997).

Recentemente, testes baseados em hibridização reversa de sondas como o Line Probe Assay (LiPA) (INNO-LiPA Rif TB Assay, Innogen) e o GenoType (MTBDRPlus Hain Lifesciences) podem ser utilizados para a detecção de resistência às drogas de primeira linha. Estes testes possuem uma sensibilidade que varia de 71 a 100% e uma especificidade de 100% (ANEK-VORAPONG *et al.*, 2010; CHAGAS *et al.*, 2010). O INNO-LiPA trata-se de um método restrito a identificação de resistência a RMP enquanto o GenoType é capaz de identificar resistência a RMP e INH (LING *et al.*, 2008; ARAGO *et al.*, 2007).

Gene expert O GeneXpert MTB/RIF é uma metodologia que se propõe a diagnosticar simultaneamente casos TB e resistência a rifampicina, diretamente de amostras clínicas, em até duas horas. Em 2010, a OMS aprovou e recomendou a tecnologia para os países incorporarem em seus programas de controle a TB (IOANNIDIS *et al.*, 2011; HELB *et al.*, 2010).

Sequenciamento: Analisa todos os nucleotídeos de uma região escolhida específica do genoma. Permite estudar as mutações, detectando tanto as conhecidas como as ainda não descritas, através da análise e comparação de uma linhagem selvagem com outra qualquer, sendo possível identificar mutações que podem estar relacionadas com a resistência a determinado fármaco referencia (PAREEK *et al.*, 2011).

DNA-Microarray: metodologia baseada na análise de regiões mutadas através de um padrão estabelecido por hibridização com chip de oligonucleotídeos. O sistema é composto de uma matriz com várias sondas de DNA fixadas que, posteriormente, serão hibridizadas e os resultados registrados e interpretados utilizando-se programas computacionais (JIA *et al.*, 2012).

Alguns sistemas ditos não convencionais, embora possuam uma velocidade maior para realização do diagnóstico de TB e, por vezes, o resultado de suscetibilidade às drogas, ainda possuem diversos contrapontos, por necessitar de mão de obra especializada, ter custo extremamente elevado, utilização de meios radioativos e ainda apresentam o viés de produzir altos índices de contaminantes (KALANTRI *et al.*, 2005). Por isso, é dificultada a utilização destas metodologias como teste diagnóstico de rotina, principalmente em países em desenvolvimento, onde os recursos são escassos, e há um grande número de casos da doença (CAMINERO, 2005). No entanto, são de grande valia em laboratórios de referência onde há grandes volumes de análises e pessoal treinado (CRISTINA *et al.*, 2006)

JUSTIFICATIVA

Para um tratamento de TB adequado e também para evitar um aumento da resistência aos poucos fármacos utilizados, pelo menos pacientes com suspeita de não responderem ao esquema preconizado deveriam realizar o teste de susceptibilidade. No entanto, menos de 20% desses o fazem uma vez que os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos convencionais são muito demorados, pois necessitam de crescimento bacteriano. O sequenciamento de DNA é uma metodologia direta muito sensível, considerada padrão ouro quando se trata de diagnóstico molecular, porém muito laborioso para o uso rotineiro, além de ter o custo elevado. Os métodos comerciais moleculares, enquanto sensíveis e específicos, são demasiadamente onerosos para o uso na rotina principalmente em países em desenvolvimento. Tendo presente que a rápida identificação das linhagens resistentes pode contribuir efetivamente no tratamento e controle da TB, este trabalho visa desenvolver um método molecular que permita identificar as principais mutações em genes envolvidos com a resistência a partir cultura de TB e utilizá-lo para fins de detecção de resistência aos principais fármacos utilizados nos esquemas terapêuticos.

3. OBJETIVOS

• Objetivo Geral

Desenvolver um método molecular de hibridização em membranas para rápida detecção das mutações mais frequentes relacionadas com a resistência à RMP e INH em isolados de *M. tuberculosis*.

• Objetivos Específicos

- Padronizar uma PCR-*multiplex* com os genes *rpoB*, *katG*, *inhA* e a sequência de inserção IS6110, escolhidos para este estudo;
- Padronizar um protocolo de hibridização/sistema de detecção colorimétrico em membranas com DNAs provenientes de cultura de *M. tuberculosis* contendo as sondas dos genes *rpoB*, *katG*, *inhA* e a sequência de inserção IS6110;
- Comparar os resultados obtidos do teste desenvolvido com o sequenciamento e TSA;
- Avaliar a sensibilidade e a especificidade da técnica desenvolvida.

Capítulo 2

Detecção rápida de mutações nos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* em isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a rifampicina e isoniazida utilizando membrana (LINE-TB/MDR).

Capítulo 2. Detecção rápida de mutações nos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* em isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a rifampicina e isoniazida utilizando membrana (LINE-TB/MDR).

Autores: Sergio Ferreira Junior, Elis Regina Dalla Costa, Harrison Magdinier Gomes, Marcia Susana Nunes Silva, Benerson Salgado, Raquel de Abreu Maschmann, Philip N. Suffys, Maria L. R Rossetti

Resumo

Testes tradicionais para identificação da resistência de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) são demorados, podendo levar semanas após a cultura primária, além de necessitarem condições adequadas de biossegurança. Os testes comerciais disponíveis ainda são muito caros, o que dificulta a sua utilização em serviços públicos de saúde. Neste estudo, foi desenvolvido um ensaio de PCR multiplex com sondas fixadas em membranas (LINE-TB/MDR) capaz de identificar as mutações mais frequentes relacionadas com a resistência a rifampicina (RMP) e à isoniazida (INH) em isolados de Mtb. Os genes alvos foram *rpoB*, *katG*, região regulatória do gene *inhA* e a sequência de inserção IS6110. As mutações específicas encontradas nesses genes foram relatadas como marcadores de resistência as drogas de primeira linha da tuberculose. O ensaio foi validado em um painel de referência de 108 amostras bem caracterizadas pelo teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) e sequenciamento de DNA. Quando comparado com o TSA, a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da LINE-TB/MDR, para RMP foi de 100% para todas as análises. Para resistência à INH, a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN foi de 77%, 100%, 100% e 82%, respectivamente. Quando comparado com o sequenciamento, a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da LINE-TB/MDR, para resistência a RMP,

foi de 100% para todas as análises. Para a resistência à INH a sensibilidade, a especificidade, VPP e VPN foi de 94,3%, 100%, 100% e 94,8%, respectivamente. O ensaio desenvolvido pode ser usado como uma alternativa para a identificação rápida de isolados multirresistentes (MDR) e também a identificação do complexo Mtb.

Rapid Detection of Mutations in *rpoB*, *katG* and *inhA* Gene, of Rifampicin and Isoniazid Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Line Probe Assay

Sergio Ferreira Junior^{1,3}, Elis Regina Dalla Costa,¹ Harrison Magdinier Gomes², Marcia Susana Nunes Silva^{1,4}, Benerson Salgado¹, Raquel de Abreu Maschmann¹, Philip N. Suffys¹, Maria L. R Rossetti^{1,4}

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

² Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Mycobacterias, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil

³ Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

⁴ Universidade Luterana do Brasil (ULBRA/RS), Brasil.

ABSTRACT

Traditional tests for *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) resistance identification are time consuming and may take weeks after the primary culture and require biosafety suitable conditions. The commercial tests available are still too expensive, hampering its use in public health services. In this study we have developed a multiplex assay (LINE-TB/MDR) able to identify the most frequent mutations related to rifampicin (RMP) and isoniazid (INH) resistance in Mtb isolates, based on colorimetric detection of hybridization on membranes, using as target genes *rpoB*, *katG*, *inhA* regulatory region genes and the insertion sequence IS6110 that were amplified by multiplex PCR. The specific mutations found in these genes have been reported as markers for resistance to tuberculosis first line drugs. The assay was validated on a reference panel of 108 samples well-characterized by the antimicrobial susceptibility test (AST) and DNA sequencing. When compared with the AST, the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the LINE-TB/MDR for

RMP, were 100% for all analyses. For INH resistance, the sensitivity, specificity, PPV and NPV were 77%, 100%, 100% and 82% respectively. When compared with sequencing, the sensitivity, specificity, PPV and NPV of the LINE-TB/MDR, for RMP resistance, were 100% for all analyses. For INH resistance the sensitivity, specificity, PPV and NPV were 94.3%, 100%, 100% and 94.8% respectively. The developed assay could be used as an alternative for rapid identification of multidrug resistant (MDR) isolates, and also the Mtb complex identification.

INTRODUCTION

Tuberculosis is one of major public health concern with 8 million new cases and 1.4 million deaths each year (1). In 2008, the World Health Organization (WHO) reported a large increase of multidrug-resistant tuberculosis (TB) (MDR-TB) cases (2) and this situation is even more dramatic due to the HIV pandemic (3). The emergence and spread of these isolates in addition of extensively resistant isolates (XDR-TB) mean a serious problem for tuberculosis control programs, particularly in developing countries (4). But several others factors are responsible for this global scenario, most of them related to economic and social issues such as poverty, drug addiction and difficult access to the health programs (5,6). The WHO points out that worldwide, among new TB cases, about 14% are MDR and among the previously treated patients this can reach 50% (7). Thus, it is necessary to develop efficient and low-cost diagnostic assays that could lead early disease detection and bacilli resistance. INH resistance appears associated with mutations in one or more genes, such as those encoding catalase-peroxidase [*katG* gene (codon 315)] and the enoyl-ACP reductase enzyme involved in the mycolic acid biosynthesis [*inhA* (-15 nucleotide)] (8-10) whereas for RIF resistance

is achieved by mutations in *rpoB* gene encoding RNA polymerase β -subunit. In approximately 95% of the isolates (11,12) the resistance is due to mutations, small deletions or insertions within a region of 81 bp of the *rpoB* gene, occurring mainly in codons 531, 526 and 516 (13,14) Nowadays, especially in developing countries, the AST is still carried out by phenotypic methods based on microbial culture and primary AST using Lowenstein-Jensen solid medium, because this assay is not expensive, and do not require high technology. However, the assay takes a long time for results and requires trained workers (15). Commercial methods that can identify the mycobacterial genotype or detect most resistance to the primary first-line drugs, such as GeneXpert and MTBDRPlus (Hain Lifesciences) are available (16-21). However, the phenotypic or genotypic characterization of every *Mtb* isolate or even every sputum sample containing acid-fast bacilli (AFB) is currently time-consuming as well as costly and is practical only in low TB burden countries, being considered to expensive, especially for developing countries where the TB situation and MDR-TB are of major concern (6). Therefore, in 2011, the WHO recommended that new methods should be developed based on rapid identification, aiming to stop the transmission, especially of the resistant bacilli (22). The goal of the present study was to develop a molecular assay based on membranes hybridization, aiming rapid detection of the mutations more frequently related to RIF and INH *Mtb* resistance.

MATERIAL AND METHODS

Obtaining DNA and susceptibility testing

One hundred and eight DNA samples were obtained from *Mtb* cultures of the collection of the Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS), Porto Alegre, Brazil. The genes coding for *rpoB*, *katG* and *inhA*, related to INH and RIF respectively, from these samples were previously sequenced (23) (24). The reference strain H37Rv (ATCC27294) was used as a control. AST was tested by the standard proportion method [25], at the Laboratório Central do Rio Grande do Sul, Brazil (IPB/LACEN-RS), which is the regional reference laboratory in Mycobacteria.

Oligonucleotide design

The oligonucleotide probes were designed using the Software Primer express v2.0 (Applied Biosystems). Fourteen probes to identify WT and mutant genotypes related to RMP and INH resistance were designed. Additionally, one oligonucleotide probe specific for identification of the insertion sequence IS6110.

Membrane preparation (Biodyne C) and oligonucleotides binding

The negatively-charged nylon membrane (Biodyne C, Pall Corporation) was activated in a solution of 16% (w/v) EDAC1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, Acros Organics) for 20 min at room temperature (RT) and washed in distilled water for 2 min at RT. Then 10 μ L each of oligonucleotides probe, diluted to the appropriate concentration in 0,5M NaHCO₃ (pH 8.4) were plotted into 15 circles previously designed at the membrane and incubated for 1 min at RT. All

oligonucleotide probes were designed with a 5'-terminal amino group. Membranes were incubated in 0.1 M NaOH for 10 min, washed in distilled water for 2 min. at RT, washed in 2x SSC/0,1% SDS for 10 min at 50°C and finally incubated in 20 mM EDTA (pH 8.0) for 15 min at RT. The membranes were then transferred into a polyethylene tube and stored at 4°C for late use.

Reverse-line blot hybridization and colorimetric detection

The reverse hybridization and colorimetric detection were performed based on the protocol previously described (23,24) Some changes in the protocol were performed in order to decrease the time of the technique and optimize the performance of the method. The membranes were washed in 2X SSC / 0.1% SDS for 5 min at 50°C and incubated in 2 x SSC with 5% bovine serum albumin (BSA) at 50°C for 15 min. Twenty five µL of each PCR reaction was added to 150 µL of 2X SSC / 0.1% SDS, denatured at 100°C for 10 min and transferred into a bath ice. The denatured PCR product was then added into polyethylene tube containing a membrane in 1.4 mL of hybridization solution (2X SSC / 0.1% SDS). The hybridization was achieved by incubating at 62°C for 30 min. After hybridization, the membranes were washed in 2X SSC / 0.5% SDS at 57°C for 10 min each. The membranes were then treated with a Tris-buffered saline (TSB) (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) containing 6% BSA for 30 min at 50°C. The membranes were incubated in TSB buffer, containing 0.33 µg/mL streptavidin-alkaline phosphatase conjugate, for 15 min at RT. The unbound conjugate was removed by washing in TSB buffer for 10 min, followed by alkaline phosphatase buffer (AP buffer) (100 mM Tris -HCL, 150 mM NaCl and 5 mM mgCL₂. 6H₂O, pH 9.5) for 10 min at RT. The hybridization was visualized by adding 40 µg/mL 5-bromo-4 chloro-3indoyl-phosphatase and 82.5 µg/mL nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT, sigma) in AP buffer

and incubated for 10 min at RT. A purple precipitate was observed when there was a perfect match between the probe and the biotinylated PCR product. The colorimetric reaction was blocked with distilled water, the membranes were dried at RT.

Extraction of nucleic acids

Nucleic acids were extracted from *M. tuberculosis* culture using the CTAB method describe by van Soolingen et al (26).

Amplification of *rpoB*, *katG*, *inhA* and IS6110 genes

The multiplex PCR was performed using the primer described in Table 1. The reverse primers were biotin labeled and the PCR-multiplex was standardized in a final volume of 50 μ l containing 200 μ M each dNTP, 10 mM Tris-HCL (pH8.3) 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 pmoles of each primer (Rif1/Rif2), and 25 pmoles (*katG1/katG2*, *inhA1/inhA2*, IS1/IS2), 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (invitrogen/USA) and 1 μ l (100 ng/ μ l) of culture DNA. The PCR reactions were carried out as follows: The PCR reactions were carried out as follows: 3 min at 95°C, 30 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 60°C, 1.5 min at 72°C, and 4 min at 72°C. Two controls were used for PCR: positive control (*M. tuberculosis* H37Rv DNA, 100 ng) and a negative control (water). Standardization of amplification reactions, the PCR products were analyzed on polyacrylamide gel electrophoresis, followed by detection in UV light after staining with ethidium bromide.

Analysis Considerations

A schematic representation showing the positions of the probes for *rpoB*, *katG*, *inhA* and IS6110 is presented in Figure 1. When the hybridization appears with the probes number 1 to 5 means that the isolate present a WT *rpoB* gene. These probes represent the region of 81 pb call RDR (resistance-determining regions). The isolate was considered mutated for *rpoB* when no hybridization was observed to any of these probes, independent of hybridization to the probes number 6 to 10. A strain was considered mutated for *inhA* gene when hybridization occurred to probe number 11 and wt when probe number 12 appears hybridized. Isolates with wt *katG* gene present hybridization to the probe number 13 and when mutated, to the probe number 14. The hybridization to probe number 15 (IS6110) indicates that the strain belong Mtb complex. The result was considered positive when a purple precipitated appears in the circle where each probe have been plotted

RESULTS

From the selected from 108 cultures, 55 were considered sensitive for AST and WT by DNA sequencing. Fifty-three were considered MDR for AST with at least one mutation in *rpoB* gene. Forty-one isolates presented only mutations at *katG* gene and 3 only had mutation in the promoter region of the *inhA* gene; 10 isolates presented mutations in the *katG* and *inhA* genes, simultaneously; seventeen per cent (9/53) had no mutation in *katG* and *inhA* by sequencing. Table 2, presents detailed information about the detected mutation by sequencing.

LINE-TB/MDR performance in wild genotype isolates

The LINE-TB/MDR achieved 100% sensitivity (55/55) in the isolates analyzed, when the isolates had wild genotype and outcome concurrently susceptible to RIF and INH according to the AST. These isolates showed hybridization to probes 1 to 5, related to *rpoB* gene, and hybridization to probes 12 and 13 regarding to the *inhA* and *katG* gene, showing no mutation, as shown in (Figure 2A). In addition, it is important to highlight that in all of the 108 isolates hybridization was observed with the probe number 15 referent to IS6110 insertion sequence, confirming that the all analyzed strains belong to the *M. tuberculosis* complex, as shown in Figure 2 A,B,C,D,and E.

LINE-TB/MDR assay performance to detect Rifampicin resistance

All the RMP resistant isolates (n=53) had at least one mutation at the *rpoB* RDRR region by sequencing. According to the data of our previous work [23], the frequency of mutations were 69.8% (38/53), 22.6% (12/53) and 5.4% (3/53) at codons 531, 526 and 516, respectively. The LINE-TB/MDR was able to correctly identify all mutations occurring at codon 531, when the SNP involved resulted in amino acid change (Ser → Leu), as was shown by hybridization to probes 1 to 4, and 9 in the Figure 2B. The method, correctly, recognized 8 mutant isolates at codons 526; four samples presenting change in amino acid (Asp → His) and the other four samples the change (His → Tyr). The probe 516 in the LINE-TB/MDR correctly identified a single strain that had the amino acid change (Asp → Val). Four mutated isolates at codon 526 and two at codon 516 had no complementary probe in our method. However, no hybridization was observed to probe 4 related to codon 526, neither to probe 2 related to

codon 516 (Figure 2E). Comparison of the results obtained from LINE-TB/MDR assay (n = 108) and the results from *rpoB* RDRR region by previous sequencing is summarized in Table 3. The Kappa value (k) (95% CI), showed agreement of 1 (99.5–100.0). The PPV and NPV were 100% for both analyses.

LINE-TB/MDR assay performance to Isoniazid resistance

The LINE-TB/MDR method was applied in the analysis of isolates with specific mutations in *katG* and *inhA* genes, in order to evaluate the performance in INH resistance detection. Eighty-three per cent (44/53) of the INH-resistant isolates had mutations in the analyzed genes. Of these 41 (77.3%) presented mutations in *katG* mutation, at codon 315 (AGC-ACC) with the amino acid substitution (Ser → Thr) according to the sequencing data. Of them, the LINE-TB/MDR was able to correctly identify 36 (88%), and it was possible to observe clearly hybridization to probe number 14 (*katGM*) as shown in Figure 2C. Of the discordant isolates, 3 hybridized to wild type probe number 13 (*KatGWT*), although they had the mutation at codon 315 by sequencing. Two isolates did not hybridize to probe 13 (*katGWT*), neither to probe 14 (*katGM*). Of the 12 isolates with wild type genotype for *katG*, the LINE-TB/MDR correctly identified 11 (91.6%) which hybridized to probe 13 (*katGWT*) as expected. A single isolate had no hybridization to probe 13 (*katGWT*), but neither to probe 14 (*katGM*). Among the 53 isolates analyzed, 40 (75.4%) presented a *inhA* wild genotype. Of these, the LINE-TB/MDR was able to correctly identify 37 (92.5%) showing hybridization to probe number 12 (*inhAWT*), as shown in figure 2D, with loss of hybridization to probe 11 (*inhAM*). Three isolates presented discordant results to sequencing data; one of them hybridized to probe 11, corresponding to a mutated region of the gene (*inhAM*); and two isolates did not hybridize to probe 11 (*inhAM*), neither to

probe 12 (*inhAWT*). Twenty-five per cent of the INH resistant (13/53) isolates had mutations in the promoter region of the *inhA* gene (C-15T), of these, 10 (77%) were correctly identified, showing hybridization to probe 11 (*inhAM*). Three isolates showed no hybridization to both probes 11 and 12. Comparison of the results obtained from LINE-TB/MDR assay (n=108) and the results from *katG* and *inhA* region by previous sequencing is summarized in Table 3. Kappa value (k) (95% CI) showed agreement of 0.889 (82.5–95.2) for *katG* and *inhA*. The negative predictive value and positive predictive value were 94.8 e 100% respectively, when compared with sequencing.

Comparison between LINE-TB/MDR and Drug Susceptibility Testing

The LINE/MDR accurately characterized 100% (55/55) of the RIF and INH susceptible isolates, according to AST, binding only on probes 1 to 5 at *rpoB* gene and with the probe number 12 at *inhA* gene, as well with the probe number 13 at *katG* gene. The Kappa value, positive predictive value, negative predictive value respectively (k) (95% CI) showed agreement of 1 (99.5–100.0), 100% and 100% for *rpoB*, when it was done the comparison between the LINE-TB/MDR and the RMP AST, in Table 3. Among 53 INH resistant isolates defined phenotypically by AST, 75.5% (44/53) were accurately characterized by our assay, with hybridization at least one *katG* or *inhA* probes. The assay was not able to identify 22.6% (12/53) of the INH resistance isolates according to AST in Table 3. The Kappa value, positive predictive value, negative predictive value respectively, (k) (95% CI) showed agreement of 0.887 (82.2–95.1), 100% and 82% in comparison of the LINE-TB/MDR and the AST.

DISCUSSION

MDR-TB is defined as resistance to INH and RMP, the main drugs to TB treatment (27). Most of the acquisition of drug resistance in *Mtb* is due to point mutations (28-30). Because *Mtb* is a clonal organism, these point mutations accumulate and are preserved in the different lineages (31,32). These traits make this bacterium especially suitable for characterization by single nucleotide polymorphism (SNP) analysis (33-35). A screening panel was created to track mutations in *rpoB*, *katG* and *inhA*, as well to identify Mtb complex. These mutations are already known to be associated with INH or RIF resistance (36,11,37). In Brazil, MDR-TB diagnosis, as recommended by the Ministry of Health is performed in LJ and Middlebrook 7H10 solid media, used in the AST, but these methods have several limitations mainly related to diagnosis time, which can take 12 till weeks (15). For drug resistance detection, tests based on reverse hybridization probes such as Line Probe Assay (LiPA), (INNO-LiPA assay Rif TB, Innogen GenoType MTBDRplus (Hain Lifesciences) and Xpert MTB/RIF (Cepheid Sunnyvale, CA), can be used. These tests have a sensitivity ranging from 71 to 100% and a specificity of 100% (38,39). INNO-LiPA is restricted to RMP resistance identification and GenoType is able to identify RMP and INH resistance, however, both are expensive and not available in developing countries (39-41). More recently, a molecular test was developed to detect *M. tuberculosis* and RMP resistance conferring mutations directly from sputum. However, that Xpert performance characteristics might be different when implemented in a scenario with few individuals with the disease relative to TB in environments with high TB burden (42). We have chosen a panel of mutation similar to those reported in other publications, with predominance of codon 531, 526 and 516 of the *rpoB* gene (43,44), codon 315 of the

katG gene (45,46) and at -15 of the *inhA* regulatory region, (44,47) for development of the test (LINE-TB/MDR). All of the 108 analyzed isolates by LINE-TB/MDR showed specific hybridization to the probe IS6110, used for *M. tuberculosis* identification, indicating that this method can be a reliable tool for tuberculosis diagnosis. This result is similar to that found by our research group when testing the DETEC-TB method (48). Of the 55 DNA samples with no mutations at the gene regions already described and sequenced, identified as susceptible according to the AST, the LINE-TB/MDR correctly identified all of them.

Of the 53 samples with mutation in the *rpoB* gene, 100% (53/53) hybridized to at least one *rpoB* mutated probe or showed no hybridization to WT probe, confirming that the isolate was not susceptible to RMP, with a great agreement (k=1) between the current test and sequencing (see Table 3). These data suggest that the LINE-TB/MDR can be used reliably to detect resistance to rifampicin, as it was found by Aslan et al., when tested a commercial kit in samples muted and no muted in *rpoB* gene (49). Our method was able to properly recognize the presence of mutations in DNA samples, in despite of the codon in which it was placed. Four isolates had mutation at codon 526: one (CAC → GTC), one (CAC → CGC), one (CAC → CCC), one (CCC → CTC) and two at codon 516 (CAA → TAC). We observed differential hybridization pattern, with no probe hybridization in the WT probes, as shown in Figure 2E. This can be explained because the created panel for mutations screening does not have complementary probes for these specific SNP's. It means thus that the assay was able to identify these particularities, since had no specific hybridization in the region of the wild type codons 516 and 526, although there is no possibility to claim exactly which mutation have occurred and the resultant amino acid. The sensitivity to detect RMP resistance

compared to the sequencing was 100%. So, the assay could be useful as a tool to rapid detection of MDR/TB isolates, since RMP mono-resistant isolates are rarely found (50). Therefore, mutations in RDRR region of the *rpoB* gene can work as an indicator for MDR-TB, just where the assay achieved its best performance. Previous studies that describes about 95 to 100% RMP resistant isolates clinical isolates carry mutations in the region of 81pb of the gene *rpoB* (47). Although most of the methods to detect mutations related to INH resistance use only *katG* gene as a target, Aslan *et al* confirm that the concomitant use of *katG* and *inhA* regulatory region probes improve sensitivity to identify INH resistance (49). In this study, only three INH resistant isolates had mutations in the *inhA* gene. The frequency that have been reported of INH resistant isolates containing a single nucleotide substitution (C→G) of the amino acid at position 315 of *katG* (Ser→Thr) ranged from 50-100% of the cases (51-53). This amino acid change seems to lead to a decrease of catalase peroxidase enzyme activity, which has been described as essential for activation of the drug (52,54). Importantly, it was shown that the *katG* S315T mutation is associated with INH resistance without diminishing the virulence or transmissibility of *Mtb* isolates (55). When the LINE/MDR was compared to AST, which is a reference for MDR/TB identification, an overall sensitivity of 86.1% (93/108) was observed. Among the 12 DNA samples that were not correctly identified as INH-resistant, nine had *inhA* and *katG* wild genotype by sequencing, although was MDR by proportions method, and only three have showed no hybridization to probes used in this work. Some studies have been confirmed that about 10-30% of *M. tuberculosis* INH resistant clinical isolates have no mutations in known genes (51). These isolates possibly have other resistance mechanisms such as efflux pumps or cell envelope permeability (41). The prevalence of *katG* and *inhA* mutations, as well the frequency and type of gene mutation, however, varies greatly among different

geographic regions, been 35-91% and 20-35%, respectively (56,53,57). The LINE-TB/MDR has achieved satisfactory results for identification of SNP involved in INH resistance, with sensitivity of 91.6% (99/108), similar to the performance found for GenoType MTBDRplus (Hain Lifesciences) and other commercial kits (40,58). A great agreement [$k=0.889$; 95% IC (82.5–95.2)] among the current test and sequencing was found. Recently, *Ioannidis et al*, evaluated the GeneXpert MTB/RIF assay with microscopically negative and positive pulmonary and extrapulmonary (16) finding values of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values similar to the results found in our study. The discrepancies among the LINE-TB/MDR method and the sequencing, were due to probes hybridization at different positions from those determined by sequencing or because the hybridization did not work. It should be noted that the LINE-TB/MDR identified 3 isolates as INH resistant by *inhAM* probe hybridization; in despite of sequencing data identified them as wild genotype to *inhA*. The possible reasons to explain these discrepancies could be by the presence of heteroresistant isolates with simultaneous sensitive and resistant clones, which would affect the sensitivity of sequencing performance (59). In summary, the LINE-TB/MDR method described in this study offers advantages over alternative techniques, allowing obtaining results within 6 hours after amplification of the target. It is a great reduction of the time to obtaining bacillus susceptibility profile. In addition, present a reduced cost compared with current commercial kit available in Brazil. The test can be easily used as a tool for the diagnosis of MDR-TB facilitating its application in routine laboratories in regions with high TB and TB/HIV burdens, especially in poor countries where tuberculosis rates are extremely high.

Table 1. Primers used for amplification and standardization of multiplex PCR for genes *rpoB*, *katG*, *inhA* and IS6110.

| Gene | Primer sequence (5'-3') | Size (pb) |
|-------------|--|-----------|
| IS6110 | IS1 CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC | 245 |
| | IS2 Bio- GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA | |
| <i>RpoB</i> | Rif1 GGT CGC CGC GAT CAA GGA GT | 157 |
| | Rif2 Bio-TGC ACG TCG CGG ACC TCC A | |
| <i>KatG</i> | <i>katG</i> 1 CAT GAA CGA CGT CGA AAC AG | 232 |
| | <i>katG</i> 2 Bio-CGA GGA AAC TGT TGT CCC AT | |
| <i>InhA</i> | <i>inhA</i> 1 CCT CGC TGC CCA GAA AGG GA | 248 |
| | <i>inhA</i> 2 Bio-ATC CCC CGG TTT CCT CCG GT | |



Figure 1. Schematic representation of LINE-TB/MDR. Probes position. *rpoB* WT probes, circles 1 to 5 (Rif 1, Rif 2, Rif 3, Rif 4, Rif 5). *rpoB* mutated probes, circles 6 to 10 (Rif1M, Rif2M, Rif3M, Rif4M, Rif5M). 11. *inhA*M 12. *inhA*wt 13. *katG*wt, 14. *katG*M, 15. IS6110.

Table 2. Global distribution of the sequencing of the 108 isolates analyzed

| Gene | Codon | Nucleotide change | Amino acid change | Isolates n (%) |
|-------------|-------|-------------------|-------------------|----------------|
| <i>rpoB</i> | 531 | TCG-TTG | Ser → Leu | 37 (69.8) |
| | | TCG-TGG | Ser → Trp | 1 (1.88) |
| | 526 | CAC-GAC | His → Asp | 4 (7.5) |
| | | CAC-GTC | His → Leu | 1(1.88) |
| | | CAC-TAC | His → Tir | 4 (7.5) |
| | | CAC-CGC | His → Arg | 1(1.88) |
| | | CAC-CCC | His → Pro | 1(1.88) |
| | | CAC-CTC | His → Leu | 1(1.88) |
| | 516 | CAA-TAC | Asp → Tyr | 2 (3.77) |
| | | CAA-GTC | Asp → Val | 1 (1.88) |
| <i>KatG</i> | 315 | AGC-ACC | Ser → Thr | 41 (77.3) |
| | | WT | - | 12 (22.7) |
| <i>inhA</i> | -15 | <i>C-T</i> | - | 13 (24.6) |
| | | <i>WT</i> | - | 40 (75.4) |
| | | - | - | - |
| WT | | <i>WT</i> | | 55 (100) |

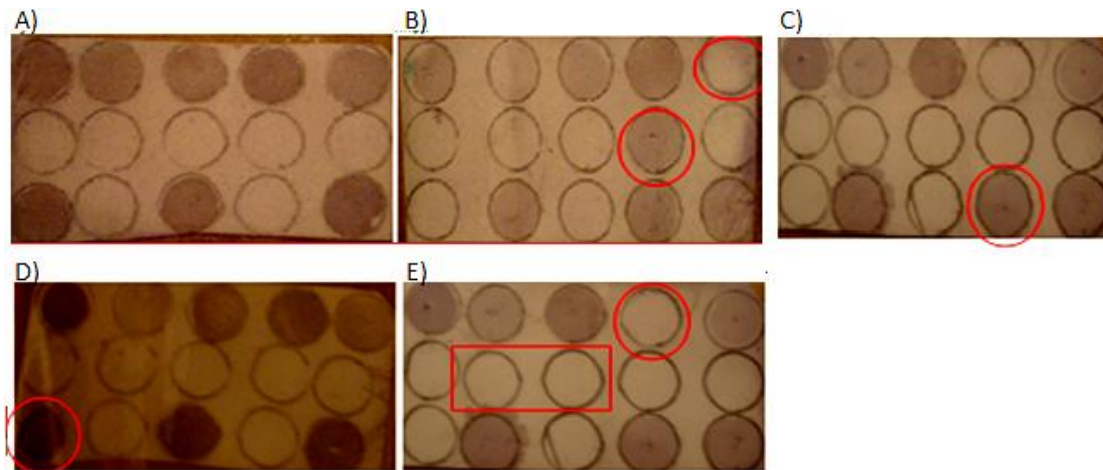


Figure 2. **A:** Example of the WT result to the 3 genes *rpoB*, *katG* e *inhA*. **B:** Example of a strain mutated in the 531 region of the *rpoB* gene, with no hybridization with the Rif5wt probe and hybridization with the Rif4M. **C:** Hybridization with the 14 *katGM* probe. **D:** Hybridization with the probe number 11. **E:** Hybridization was not observed with the rif4 probe, what suggested that there are a mutation with the *rpoB* gene codon 526, although, the method do not allow identifying which one mutation is occurring since no hybridization was observed with the rif2M and rif3M probes.

Table 3. Comparison of the results obtained for the identification of mutation with the sequencing and with susceptibility test.

| Drug | Results (n=108) | | Compared results (n=108) | | | | | | | |
|---------|-----------------|-----|--------------------------|----------------|----------------|-----------------|----------------------|---------|------|-------|
| | LINE-TB/MDR | Seq | LINE-TB/MDR | LINE-TB/MDR | LINE-TB/MDR | LINE-TB/MDR | Kappa (%) (95%CI) | p-value | VPP | VPN |
| | | | wt/ Seq wt | mut/ Seq wt | wt/ Seq mut | mut/ Seq mut | | | | |
| INH wt | 58 | 64 | 58 | 3 | 3 | 44 | 88,9 (82.5– 95.2) | <0.001 | 100% | 94.8% |
| INH res | 38 | 44 | | | | | | | | |
| RMP wt | 55 | 55 | 55 | 0 | 0 | 53 | 100 (99.5– 100.0) | <0.001 | 100% | 100% |
| RMP res | 53 | 53 | | | | | | | | |

| Drug | Resistant results (n=108) | | Compared results (n=108) | | | | | | | |
|---------|---------------------------|-----|--------------------------|----------------|----------------|-----------------|----------------------|---------|------|------|
| | LINE-TB/MDR | AST | LINE-TB/MDR | LINE-TB/MDR | LINE-TB/MDR | LINE-TB/MDR | Kappa (%) (95%CI) | p-value | VPP | VPN |
| | | | wt/ TSA wt | mut/ TSA wt | wt/ TSA mut | mut/ TSA mut | | | | |
| INH wt | 55 | 55 | 55 | 0 | 12 | 41 | 88,7 (82.2– 95.1) | <0.001 | 100% | 82% |
| INH res | 41 | 53 | | | | | | | | |
| RMP wt | 55 | 55 | 55 | 0 | 0 | 53 | 100 (99.5– 100.0) | <0.001 | 100% | 100% |
| RMPres | 53 | 53 | | | | | | | | |

REFERENCES:

1. **WHO**: *Global Tuberculosis Control. Report WHO 2009*, **1**:1-87.
2. **Loddenkemper R, Hauer B**: *Drug-Resistant Tuberculosis: A world wide epidemic Poses a new challenge. Medicine 2010*, **107**:9-10.
3. **Padmapriyadarsini C, Narendran G, Swaminathan S**: *Diagnosis & treatment of tuberculosis in HIV co-infected patients. Indian J Med Res 2011***122**:850-865.
4. *Report G, Surveillance response ON: Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) 2010. 2010*:1-71.
5. **Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Drobniewski FA**, *Microbiol JCLINM: Comparison of Three Molecular Assays for Rapid Detection of Rifampin Resistance in Mycobacterium tuberculosis. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 1998*, **36**:1969-1973.
6. **Rylance J, Pai M, Lienhardt C, Garner P**: *Priorities for tuberculosis research : a systematic review. The Lancet Infectious Diseases 2010*, **10**:886-892.
7. **Palomino JC, Martin A, Portaels F**: *Rapid drug resistance detection in Mycobacterium tuberculosis: a review of colourimetric methods. Clinical Microbiology and Infectious 2007*, **13**:754-762.
8. **Kozhamkulov U, Akhmetova A, Rakhimova S, Belova E**: *Molecular Characterization of Rifampicin- and Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated in Kazakhstan. Japanese Journal of Infectious Diseases 2011*, **64**:253-255.
9. **Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z**: *Mode of action of pyrazinamide : disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2003*, **52**:790-795.
10. **Vilch C, Jacobs WR**: *The Mechanism of Isoniazid Killing : Clarity Through the Scope of Genetics. The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics 2007*, **61**:35-50.
11. **Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, Hooks DP, Cowan LS, Plikaytis BB, Posey JE**: *Molecular Detection of Mutations Associated with First- and Second-Line Drug Resistance Compared with Conventional Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis † §. Antimicrobial agents and chemotherapy 2011*, **55**:2032-2041.

12. **Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Hillemann A, Moraru N:** *First Evaluation of an Improved Assay for Molecular Genetic Detection of Tuberculosis as Well as Rifampin and Isoniazid.* *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 2012, **50**:1264.
13. **Kozhamkulov U, Akhmetova A, Rakhimova S, Belova E:** *Molecular Characterization of Rifampicin- and Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated in Kazakhstan.* *Japanese journal infection disease* 2011, **64**:253-255.
14. **Zaczek A, Brzostek A, Augustynowicz-kopec E, Zwolska Z, Dziadek J:** *Genetic evaluation of relationship between mutations in rpoB and resistance of Mycobacterium tuberculosis to rifampin.* *BMC microbiology* 2009, **8**:1-8.
15. **BRASIL:** *Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil.* 2010:1-186.
16. **Ioannidis P, Papaventsis D, Karabela S, Nikolaou S, Panagi M, Raftopoulou E, Konstantinidou E, Marinou I, Kanavaki S:** *Cepheid GeneXpert MTB / RIF Assay for Mycobacterium tuberculosis. Detection and Rifampin Resistance Identification in Patients with Substantial Clinical Indications of Tuberculosis and Smear-Negative Microscopy Results.* *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 2011, **49**:3068-3070.
17. **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* 2005, **43**:3699-3703.
18. **Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J:** *Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology.* *Journal of clinical microbiology* 1997, **35**:907-14.
19. **Nikolayevsky V, Brown T, Balabanova Y, Ruddy M, Fedorin I:** *Detection of Mutations Associated with Isoniazid and Rifampin Resistance in Mycobacterium tuberculosis Isolates from Samara Region , Russian Federation.* *Journal of clinical microbiology* 2004, **42**:4498-4502.
20. **Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De 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* 1997, **41**:2093-8.
21. **Zhao J-R, Bai Y-J, Wang Y, Zhang Q-H, Luo M, Yan X-J:** *Development of a pyrosequencing approach for rapid screening of rifampin, isoniazid and ethambutol-resistant Mycobacterium tuberculosis.* *The international journal of*

tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease 2005, **9**:328-32.

22. **Global Tuberculosis Control.** 2010:1-218.

23. **Maschmann RD a, Verza M, Silva MS, Sperhackle RD, Ribeiro MO, Suffys PN, Gomes HM, Tortoli E, Marcelli F, Zaha A, Rossetti MLR:** *Detection of rifampin-resistant genotypes in Mycobacterium tuberculosis by reverse hybridization assay. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2011, **106**:139-45.

24. **Verza M, Maschmann RDA, Susana M, Silva N, Regina E, Costa D, Ribeiro MO, Rosso F, Suffys PN, Tortoli E, Marcelli F, Zaha A, Lucia M, Rossetti R:** *In house colorimetric reverse hybridisation assay for detection of the mutation most frequently associated with resistance to isoniazid in Mycobacterium tuberculosis.* 2009, **104**:710-714.

25. **G. CANETTI, S.FROMAN, J.GROSSET, P. HAUDUROY, MILOSLAVA LANGEROVÁ, H.T. MAHLER, GERTRUD DAM:** *Measurement of sensitivity of the tuberculous acillus to antibacillary drugs by the method of proportions; Methodology, resistance criteria, results and interpretation. Revue de tuberculose et de pneumologie* 1963, **27**:217-272.

26. **van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW van EJ:** *DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis. Methods in Enzymology* 1994, **235**:196-205.

27. **Laurenzo D, Mousa SA:** *Acta Tropica Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis and current status of rapid molecular diagnostic testing. Acta Tropica* 2011, **119**:5-10.

28. **Ramaswamy S, Musser JM:** *Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 1998, **79**:3-29.

29. **Riska PF, Jacobs WR, Alland D:** *Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2000, **4**:S4-10.

30. **Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM:** *Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**:9869-74.

31. **Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST:** *A new evolutionary scenario for the*

Mycobacterium tuberculosis complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**:3684-9.

32. **Smith NH, Dale J, Inwald J, Palmer S, Gordon SV, Hewinson RG, Smith JM:** *The population structure of Mycobacterium bovis in Great Britain: clonal expansion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**:15271-5.

33. **Arnold C, Westland L, Mowat G, Underwood A, Magee J, Gharbia S:** *Single-nucleotide polymorphism-based differentiation and drug resistance detection in Mycobacterium tuberculosis from isolates or directly from sputum. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2005, **11**:122-30.

34. **Filliol I, Motiwala AS, Cavatore M, Hazbón MH, Bobadilla M, Fyfe J, García-garcía L, Rastogi N, Sola C, Zozio T, Guerrero MI, León CI, Crabtree J, Angiuoli S, Eisenach KD, Durmaz R, Joloba ML, Rendón A, Sifuentes-osornio J, De AP, Cave MD, Fleischmann R, Thomas S, Alland D, Qi W, Hazbo MH, Garci L:** *Global Phylogeny of Mycobacterium tuberculosis Based on Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis : Insights into Tuberculosis Evolution , Phylogenetic Accuracy of Other DNA Fingerprinting Systems , and Recommendations for a Minimal Standard SNP Set. Journal of Bacteriology* 2006, **18**:1-17.

35. **Gutacker MM, Mathema B, Soini H, Shashkina E, Kreiswirth BN, Graviss EA, Musser JM:** *Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of Mycobacterium tuberculosis strains from 4 geographic sites. The Journal of infectious diseases* 2006, **193**:121-8.

36. **Barnard M, Albert H, Coetzee G, Brien RO, Bosman ME:** *Rapid Molecular Screening for Multidrug-Resistant Tuberculosis in a High-Volume Public Health Laboratory in South Africa. American Journal of respiratory and critical medicine* 2008, **177**:787-792.

37. **Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, Leite CQF, Sato DN, Shikama MDL, Mamizuka EM, Hirata RDC, Hirata MH:** *Screening and Characterization of Mutations in Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates Obtained in Brazil. Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004, **48**:3373-3381.

38. **Syre H, Kross M, Stavrum R, Ti T, Phyu S:** *Isoniazid and rifampicin resistance-associated mutations in Mycobacterium tuberculosis isolates from Yangon , Myanmar: implications for rapid molecular testing. Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009 **125**:694-701.

39. **Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, Soyler I:** *Evaluation of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates. Journal of clinical microbiology* 2006, **44**:2338-42.

40. **Ling DI, Zwerling AA, Pai M:** *GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. European Respiratory Journal* 2008, **32**:1165-1174.
41. **Mäkinen J, Marttila HJ, Marjamäki M, Viljanen K, Soini H, Ma J, Marjama M, Viljanen MK:** *Comparison of Two Commercially Available DNA Line Probe Assays for Detection of Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Comparison of Two Commercially Available DNA Line Probe Assays for Detection of Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 2006, **44**:1-4.
42. **Dorman SE, Chihota VN, Lewis JJ, Shah M, Clark D, Grant AD, Churchyard GJ, Fielding KL:** *Performance Characteristics of the Cepheid Xpert MTB/RIF Test in a Tuberculosis Prevalence Survey. PloS one* 2012, **7**:e43307.
43. **Prasad R:** *Multidrug and extensively drug - resistant tuberculosis management : Evidences and controversies. Lung India* 2012, **29**:154-159.
44. **Sekiguchi J-ichiro, Miyoshi-akiyama T:** *Detection of Multidrug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Detection of Multidrug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Journal of clinical microbiology* 2007, **45**:179-192.
45. **Rouse DA, DeVito JA, Li Z, Byer H MS:** *Site-directed mutagenesis of the katG gene of Mycobacterium tuberculosis: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. Molecular microbiology* 1996, **22**:583-592.
46. **Arago LM, Alcaide F, Borrell S, Carden E, Jose J, Martin-casabona N, Moreno C, Salvado M, Coll P:** *Multicenter Laboratory Evaluation of the MB / BacT Mycobacterium Detection System and the BACTEC MGIT 960 System in Comparison with the BACTEC 460TB System for Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis . JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 2007, **45**:1766-1770.
47. **Palomino JC:** *Molecular detection , identification and drug resistance detection in Mycobacterium tuberculosis. Immunological Medical microbiology* 2009, **2**:1-9.
48. **Michelon CT, Rosso F, Schmid KB, Sperhackle RD, Oliveira MM, Kritski AL, Jr LR, Regina E, Costa D, Ribeiro AW, Verza M, Cafrune PI, Susana M, Silva N, Kuhleis D, Zaha A, Lucia M, Rossetti R:** *Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for Mycobacterium tuberculosis detection. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2011, **106**:194-199.
49. **Aslan G, Tezcan S, Serin MS, Emekdas G:** *Genotypic Analysis of Isoniazid and Rifampin Resistance in Drug-Resistant Clinical Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates in Southern Turkey. Japanese journal infection disease* 2008, **61**:255-260.

50. **Malhotra S, Cook VJ, Wolfe JN, Tang P, Elwood K, Sharma MK:** *A mutation in Mycobacterium tuberculosis rpoB gene confers rifampin resistance in three HIV-TB cases. Tuberculosis 2010, 90:152-157.*
51. **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 Use of the Genotype MTBDR Assay for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 2005, 43:1-6.*
52. **Zhang M, Yue J, Yang Y-ping, Zhang H-mei, Lei J-qiang, Jin R-liang, Zhang X-lian, Wang H-hai:** *Detection of Mutations Associated with Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis Isolates from China Detection of Mutations Associated with Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis Isolates from China. Jour 2005, 43:1-7.*
53. **Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MSN, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, Espinoza RC, Palaci M, Telles M a, Ritacco V, Suffys PN, Lopes ML, Campelo CL, Miranda SS, Kremer K, da Silva PEA, Fonseca LDS, Ho JL, Kritski AL, Rossetti MLR:** *Correlations of mutations in katG, oxyR-ahpC and inhA genes and in vitro susceptibility in Mycobacterium tuberculosis clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. BMC microbiology 2009, 134, 9:39.*
54. **Sekiguchi J-ichiro, Miyoshi-akiyama T, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, Kobayashi I, Morita K, Augustynowicz-kopec E:** *Detection of Multidrug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Detection of Multidrug Resistance in Mycobacterium tuberculosis . Journal of clinical microbiology 2007, 45:179-192.*
55. **Cohen TED, Becerra MC, Murray MB:** *NIH Public Access. MICROBIAL DRUG RESISTANCE 2009, 10:280-285.*
56. **Piersimoni C, Scarparo C:** *Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Clinical Samples MINIREVIEW Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Clinical Sa. 2003.*
57. **Silva MSN, Senna SG, Ribeiro MO, Valim ARM, Telles MA, Kritski A, Morlock GP, Cooksey RC, Zaha A, Rossetti MLR, Silva SN, Valim RM:** *Mutations in katG , inhA , and ahpC Genes of Brazilian Isoniazid-Resistant Isolates of Mycobacterium tuberculosis Isoniazid-Resistant Isolates of Mycobacterium tuberculosis. Journal 2003, 41:1-5.*
58. **Bonington a, Strang JI, Klapper PE, Hood SV, Rubombora W, Penny M, Willers R, Wilkins EG:** *Use of Roche AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis PCR in early diagnosis of tuberculous meningitis. Journal of clinical microbiology 1998, 36:1251-4.*

59. Deun AV, Barrera L, Bastian I, Fattorini L, Hoffmann H, Kam KM, Rigouts L, Ru S, Wright A: *Mycobacterium tuberculosis* Strains with Highly Discordant Rifampin Susceptibility Test Results. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 2009, **47**:3501-3506.

Capítulo 3

Discussão geral e perspectivas

Discussão geral

Novas ferramentas diagnósticas são necessárias para o controle global da TB embora o progresso em pesquisas têm sido feito, ainda existem importantes lacunas em nosso conhecimento da biologia básica do *M. tuberculosis* (GAGNEUX, 2011). Atualmente a TB possui o segundo maior índice de mortalidade em adultos, causada por uma doença infecciosa, sendo responsável por cerca de 2 milhões de mortes ao ano em todo o mundo (RAVIGLIONE et al., 2002). A alta prevalência de TB no mundo, juntamente com o aumento da incidência de MDR-TB, (LI et al., 2012; LAURENZO et al., 2011) e, recentemente, a XDR-TB, apresentam uma séria ameaça para a saúde global (WHO, 2008b). Pacientes com MDR e XDR-TB necessitam de tratamento especial incluindo a administração com medicamentos de segunda linha que acarretam em sérios efeitos colaterais ao paciente, aumentando drasticamente o período de internação, agregando maiores custos ao tratamento além de diminuir muito as chances de cura (WAI et al., 2010). Entender os eventos genéticos que levam a resistência às drogas em isolados de *M. tuberculosis*, assim como sua prevalência em diferentes áreas geográficas, é importante para que seja desenvolvido melhores diagnósticos, antibióticos, novas vacinas e testes moleculares mais rápidos e precisos, essencial para a correta administração das drogas ao paciente, contribuindo para a redução do tempo e custo total do tratamento, além de quebrar a cadeia de transmissão do bacilo (VIEDMA et al., 2002)

A resistência micobacteriana as drogas anti-TB pode ser o resultado de mutações espontâneas que ocorrem exercida sob pressão dos antibióticos em genes codificantes ou enzimas envolvidas na ativação da droga. Mutações pontuais, deleções ou inserções, associadas à resistência já são bem descritos na literatura (RAMASWAMY et al., 1998). O *M. tuberculosis* por ser um organismo clonal, que acumula e preserva mutações em diferentes linhagens, (BROSCH et al., 2002; SMITH et al., 2003), tornam-se especialmente adequado para a caracterização e diagnóstico de resistência através de análise de *single nucleotide polymorphism* (SNP) (ARNOLD et al., 2005; FILLIOL et al., 2006; GUTACKER et al., 2006).

No Brasil o diagnóstico de MDR-TB é realizado através do método das proporções em meio sólido como o 7H10 LJ e Middlebrook, segundo orientação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). No entanto, esta técnica só pode ser realizada após o crescimento primário da cultura bacteriana. Isto pode levar até quatro semanas, além de necessitar de técnicos qualificados e laboratórios bem equipados, dois itens dos quais raramente estão disponíveis em países em desenvolvimento (YOUNG *et al.*, 2008).

A técnica dos métodos das proporções é indicada para pacientes com baciloscopia positiva que não se torna negativa após dois meses de tratamento, para pacientes com baciloscopia negativa que volta a ser positiva durante o tratamento para TB e para aqueles tratados previamente para TB, isto é, nos casos de recidivas. Também, são candidatos ao teste os pacientes coinfetados com HIV e TB e pacientes com TB que mantiveram contato com pacientes com suspeita de TB resistente ou TB resistente confirmada (ROSSETTI *et al.*, 2002)

Recentemente, o uso de ferramentas de diagnóstico molecular para o *screening* de pacientes com risco de MDR-TB foi recomendado pela OMS. Três metodologias foram indicadas para diagnóstico de resistência, O LiPA (INNO-LiPA assay Rif TB) (SYRE *et al.*, 2009), GenoType (Innogen GenoType MTBDRplus) (ZHANG, YEW, 2009) e o Xpert MTB/RIF (Chepheid Sunnyvale, CA) (SMALL *et al.*, 2010).

O INNO-LiPA assay Rif TB é utilizado para detecção de resistência apenas a RMP (SYRE *et al.*, 2009; CAVUSOGLU *et al.*, 2006). Em um estudo utilizando 55 DNAs extraídos de cultura de *M. tuberculosis*, SRIVASTAVA *et al.*, (2004), obtiveram 100% de sensibilidade quando comparado ao sequenciamento, para identificação de cepas RMP resistente. WATTERSON *et al* (1998) obtiveram 94,4% de sensibilidade ao analisar 38 amostras quanto a sua resistência a RMP utilizando a mesma metodologia de hibridização reversa. Outro estudo realizado por SAM *et al* (2006), para levantamento de prevalência de resistência a RMP em um serviço de rotina, analisou 1997 amostras, pulmonares e extrapulmonares, obtendo a sensibilidade de 91,2 e 86,7%, frente ao sequenciamento.

O GenoType MTBDRplus, diferentemente do INNO-LiPA, é capaz de rastrear resistência a RMP e INH, tendo como alvo os genes *rpoB* e *inhA*. Em um estudo

realizado por ANEK VARAPONG *et al* (2005), utilizando amostras com baciloscopia positiva, obtiveram a sensibilidade de 95,3% e 94,4 % frente ao sequenciamento, para identificação de resistência a INH E RMP respectivamente. Um painel de 103 cepas MDR-TB foi caracterizado na Alemanha por HILLEMANN *et als* (2005) obtendo 99% e 88,4% de sensibilidade para resistência a RMP e INH respectivamente. No entanto, ambos tem, o custo extremamente elevados, dificultando sua utilização em países em desenvolvimento (LING *et al.*, 2008).

Mais recentemente, foi desenvolvido um ensaio molecular para detectar *M. tuberculosis* e resistência a RIF diretamente de amostras clínicas. O teste geneXpert MTB/RIF promete resultados em poucas horas. IOANNIDIS *et al* (2011) avaliaram o desempenho desta tecnologia em amostras pulmonares com baciloscopia negativa obtendo 90,6%, 94,3% de sensibilidade e especificidade respectivamente. A mesma metodologia utilizando amostras extrapulmonares obteve-se 90,6%, 94,3%, de sensibilidade e especificidade respectivamente. No entanto, características de desempenho do Xpert MTB/RIF se mostra diferente em um cenário com poucos indivíduos com a doença em relação a ambientes com altos índices de TB, o que torna sua utilização mais difícil, levando em conta a realidade da TB (DORMAN *et al.*, 2012).

Em nosso estudo, um painel de triagem, (LINE-TB/MDR), foi desenvolvido para rastrear mutações no *rpoB*, *katG* e *inhA*, bem como identificar complexo *Mtb* através da sequência de inserção *IS6110*. Mutações nestes genes já são conhecidos por estarem associados com resistência a INH E RMP. (BARNARD *et al.*, 2008; CAMPBELL *et al.*, 2011; CARDOSO *et al.*, 2004). Assim, foram selecionadas amostras com as principais mutações relatadas em diversos estudos de frequência, com predominância dos códons 531, 526 and 516 do gene *rpoB* (PRASAD, 2012) (SEKIGUCHI; MIYOSHI-AKIYAMA, 2007) códon 315 do gene *katG* (ROUSE *et al.*, 1996; ARAGO *et al.*, 2007) e a região regulatória -15 do gene *inhA* (SEKIGUCHI *et al.*, 2007; PALOMINO *et al.*, 2009).

Todas as 108 cepas analisadas pelo LINE-TB/MDR apresentaram hibridização específica com a sonda *IS6110*, utilizada para identificação do *M. tuberculosis*, confirmando que é uma metodologia eficaz para o diagnóstico de TB. Estes resultados são similares aos encontrados pelo mesmo grupo de pesquisa quando utilizado a metodologia DETEC-TB (MICHELON *et al.*, 2011). Das 55 amostras de DNA sem

mutações nas regiões dos genes sequenciados, e identificadas como sensíveis, de acordo com o teste de susceptibilidade, o LINE-TB/MDR identificou correctamente todas elas.

Das 53 amostras que possuíam alguma mutação no gene *rpoB*, houve a concordância de 100% (53/53) entre o teste desenvolvido e o sequenciamento, pois hibridizaram em pelo menos, uma das sondas construídas para rastreamento das mutações (*rpoBmut*), ou se desligaram em uma das 5 sondas (*rpoBWT*) que representam a região selvagem dos 81pb da região *hot spot*. Estes dados indicaram que o teste pode ser promissor, corroborando com outros estudos que mostraram que 95 a 100% dos isolados clínicos, resistentes a RMP, carregam mutações na região de 81 pb do gene *rpoB* (códon 507-533) (CHAVES, 2000). A mesma sensibilidade foi encontrada por *ASLAN et al* (2008), quando testou um kit comercial, utilizando um painel de amostras que possuíam mutações no gene *rpoB*.

Em nosso estudo, quatro cepas tiveram mutação no códon 526: Uma troca de His→Val, uma His→Arg, uma His→pro e uma His→Leu e duas no códon 516, resultando na troca de Gln →Tyr. Nesta amostras, observamos um padrão diferenciado de hibridização, pois não houve a ligação em alguma das sondas selvagens, tão pouco nas sondas que carregavam a mutação. Isto pode ser explicado, pois no painel criado para *screening* das mutações não havia sondas complementares a estes SNP's específicos. Isso significa, portanto, que o ensaio foi capaz de identificar estas particularidades, pois não houve hibridização nas sondas selvagens referentes aos códons 516 nem 526, no entanto não há possibilidade de indicar exatamente qual a mutação ocorreu, nem o aminoácido resultante.

Outras mutações, além destas, utilizadas no estudo para rastreamento são descritas na literatura. *CAVUSOGLO et al* (2002) apresentaram diferentes mutações ocorridas no códon 513, 515, 526 e 533 em um estudo realizado na Turquia, identificando também, uma mutação fora dos 81 pb da região *hot spot* do gene *rpoB*. Outro estudo realizado na Índia por *MANI et al* (2011) apresentam 3 novas mutações dentro da região RRDR.

A sensibilidade para detecção de resistência a RMP alcançada pelo teste, quando comparado ao sequenciamento foi de 100%. Portanto, o teste pode ser utilizado como ferramenta rápida para a detecção de cepas MDR/TB, uma vez que cepas

monoresistentes a RMP são raras (MALHOTRA *et al.*, 2010). Mutações na região RDRR do gene *rpoB* pode funcionar como um indicador para a MDR-TB, justamente onde o ensaio atingiu o seu melhor desempenho (PALOMINO, 2009).

Em relação ao gene *rpoB*, a frequência da ocorrência de mutações nos códons acima citado varia bastante entre as regiões demográficas, no entanto, sempre mantém esta ordem de constância 531 (41 to 60%), 526 (9 to 31%) e 516 (7.3 to 16%) (CHEN *et al.*, 2010; YANG, S., 2011; ALMEIDA; PALOMINO, 2011). Níveis de resistência, determinado pela concentração mínima inibitória, parece estar relacionada com o tipo de mutação (SPIES *et al.*, 2008). Em isolados onde há mutação no códon 531, resultando na substituição de Leu por Trp é observado alto nível de resistência. (CAMPBELL *et al.*, 2011).

Embora muitas das metodologias utilizadas para a detecção de mutações relacionadas a resistência a INH usam somente o gene *katG* como alvo BERNARD *et al* (2008), afirmam que a adição de alvos que façam o rastreamento de mutações em genes como o *katG* e a região regulatória do gene *inhA*, aumenta consideravelmente a sensibilidade para identificação de cepas resistentes a esta droga. A prevalência de mutações em *katG* e *InhA*, bem como a frequência e o tipo de mutação variam muito entre as diferentes regiões geográficas, conforme o estudo realizado por Silva *et al* (2003), que encontrou uma variação frequencial de 35-91% e 20-35%, respectivamente para os genes *katG* e *inhA* (DALLA COSTA *et al.*, 2009; PIERSIMONI SCARPARO, 2003; SILVA *et al.*, 2003).

Mutações no gene *katG* 315 estão associadas com uma maior concentração mínima inibitória quando comparada com a encontrada em mutações na região promotora do gene *inhA*, provavelmente por isso tenha um significado clínico mais relevante (DOORN, VAN *et al.*, 2006). A frequência de isolados INH resistentes contendo uma substituição de um único nucleótido (C → G) do aminoácido na posição 315 do *katG* (Ser → Thr) variou de 50-100% dos casos (HILLEMANN *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005; DALLA COSTA *et al.*, 2009). Esta troca de aminoácido parece conduzir a uma redução de atividade da catalase peroxidase enzima essencial para a ativação do fármaco (CADE *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2007; SEKIGUCHI *et al.*, 2007). É importante ressaltar que a mutação S315T *katG* está associada com a resistência à INH, sem diminuir a virulência ou transmissibilidade das cepas de *M.*

Tuberculosis (COHEN *et al.*, 2009). Outro gene que pode estar envolvido com a resistência a INH é *ahpC*, uma proteína com atividade enzimática regulada em resposta ao estresse oxidativo. Esta coordenação é encontrada através do envolvimento de um fator de transcrição chamado *oxyR*, que responde ao estresse induzido pelo peróxido de hidrogênio (SLAYDEN; BARRY, 2000). Não está bem claro se mutações neste gene confere resistência a INH diretamente ou secundariamente como mecanismo de compensação pela diminuição da habilidade do microorganismo de sobreviver ao estresse oxidativo do meio, proporcionando alterações em *katG*. Alguns estudos sugerem que as mutações em *KatG* não só levam a uma diminuição da atividade catalase-peroxidase, mas também favorecem mutações na região promotora *ahpC* (COHEN *et al.*, 2003). Mutações neste gene ocorrem em uma frequência que pode variar de 4,8 a 24,2% (CARDOSO *et al.*, 2007; KIEPIELA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2002). Estudos mostram que cerca de 10 a 30% dos isolados clínicos de TB resistentes a INH não possuem mutações em genes conhecidos (HILLEMANN *et al.*, 2005). Estas cepas provavelmente possuem outros mecanismos de RESISTÊNCIA como as bombas de efluxo ou permeabilidade do envelope celular (SPIES *et al.*, 2008).

O LINE-TB/MDR obteve resultados satisfatórios para a identificação de SNPs envolvidos com a resistência à INH, com uma sensibilidade de 91,6% (99/108), semelhante ao encontrado no GenoType MTBDRplus (Hain Lifesciences) e outros kits comerciais (LING *et al.*, 2008; BONINGTON *et al.*, 1998). Uma elevada concordância foi encontrada [$k = 0,889$, 95% IC (82,5-95,2)] entre LINE-TB/MDR e o sequenciamento. As discrepâncias entre o método LINE-TB/MDR e sequenciamento, foram devido a hibridização de sondas em posições diferentes daquelas determinada pelo sequenciamento ou porque não houve hibridização. O teste identificou três cepas como resistentes à INH pois hibridizou na sonda *inhAM*, apesar do sequenciamento, confirmado após repetição, identificar como genótipo selvagem para *inhA*. As possíveis razões para explicar essas discrepâncias pode ser pela presença de cepas com heteroresistência ou presença simultânea de clones sensíveis e resistentes, que possam afetar o desempenho e a sensibilidade do sequenciamento (CRUDU *et al.*, 2012). Resumidamente, o método LINE-BR/MDR descritos no presente estudo oferece vantagens em relação a técnicas alternativas, permitindo a obtenção de resultados dentro de 6 horas após a amplificação do alvo. Grande redução no tempo para a obtenção de

perfil de suscetibilidade do bacilo. Além de, reduzir o custo em comparação com kit comercial atual disponível no Brasil.

Em conclusão o método desenvolvido (LINE-TB/MDR) pode ser usado como uma ferramenta para o diagnóstico da MDR-TB facilitando a sua aplicação em laboratórios de rotina em regiões com altos níveis TB e TB/HIV, especialmente em países pobres onde as taxas de tuberculose são extremamente elevadas. No entanto, a sua utilização não deva ser de forma isolada, uma vez que um resultado sensível no teste, pode não excluir a possibilidade de se tratar de um isolado resistente. Contudo o entendimento dos mecanismos moleculares, poderá possibilitar a detecção precoce da resistência, permitindo o correta assistência ao paciente e o corte da cadeia de transmissão do bacilo.

PERSPECTIVAS

O presente estudo tem como perspectiva a realização de testes diretamente em amostras clínicas, sem a necessidade de aguardar o crescimento do microrganismo em meios de cultura, o que diminuiria ainda mais o tempo para obtenção do laudo de suscetibilidade às drogas. Além disso, é interesse do grupo validar o LINE-TB/MDR em condições normais de rotina laboratorial para o diagnóstico e perfis de resistência dos isolados. Feito isso, o desenvolvimento de um kit diagnóstico de detecção rápida de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes aos principais fármacos utilizados no tratamento da TB, também faz parte das intenções do grupo do CDCT.

REFERENCIAS

ACCEPTS, J. C. M.; SOCIETY, A.; AUTHORS, L.; RESERVED, A. R. Implementation of the thin layer agar for the diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting in Homa Bay, Kenya Authors: Anandi MARTIN* 1,2 , Peter MUNGA. **Journal of clinical microbiology**, n. June, p. 1-10, 2009.

ALMEIDA DA SILVA, P. E. A.; PALOMINO, J. C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 7, p. 1417-30, jul 2011.

ANEK-VORAPONG, R.; SINTHUWATTANAWIBOOL, C.; PODEWILS, L. J. *et al.* Validation of the GenoType® MTBDRplus assay for detection of MDR-TB in a public health laboratory in Thailand. **BMC infectious diseases**, v. 10, p. 3-8, 2010.

ARAGO, L. M.; ALCAIDE, F.; BORRELL, S. *et al.* Multicenter Laboratory Evaluation of the MB / BacT Mycobacterium Detection System and the BACTEC MGIT 960 System in Comparison with the BACTEC 460TB System for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* . **journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1766-1770, 2007.

ARNOLD, C.; WESTLAND, L.; MOWAT, G. *et al.* Single-nucleotide polymorphism-based differentiation and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* from isolates or directly from sputum. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 122-30, fev 2005.

BARNARD, M.; ALBERT, H.; COETZEE, G.; BRIEN, R. O.; BOSMAN, M. E. Rapid Molecular Screening for Multidrug-Resistant Tuberculosis in a High-Volume Public Health Laboratory in South Africa. **American Journal of respiratory and critical medicine**, v. 177, n. 11, p. 787-792, 2008.

BLACKMAN, A.; MAY, S.; DEVASIA, R. A.; MARURI, F. Microcolonies in fluoroquinolone agar proportion susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* : an indicator of drug resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 6, n. 8, p. 4-9, 2012.

BONINGTON, A; STRANG, J. I.; KLAPPER, P. E. *et al.* Use of Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR in early diagnosis of tuberculous meningitis. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1251-4, maio 1998.

BRASIL. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino serviço. **Fundação Nacional da Saúde**, v. 5, p. 236, 2002.

BRASIL. **manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. [S.l: s.n.], 2008. p. 1-458

BRASIL. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Programa Nacional de Controle da Tuberculose**. [S.l: s.n.], 2010

BRASIL, S. D. Boletim Epidemiológico – Volume 43 – Especial Tuberculose. **Boletim Epidemiológico**, v. 43, p. 1-12, 2012.

- BRENNAN, P. The envelope of mycobacteria. **Annu. Rev. Bioche**, v. 64, p. 29-65, 1995.
- BROSCH, R; GORDON, S V; MARMIESSE, M. *et al.* A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3684-9, 19 mar 2002.
- BUKHARI, E. Bacillus Calmette-Guerin lymphadenitis: A 6-year experience in two Saudi hospitals. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 202-205, 2012.
- CADE, C. E.; DLOUHY, A. C.; MEDZIHRADESKY, K. F.; SALAS-CASTILLO, S. P.; GHILADI, R. A. Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* KatG : Catalase , peroxidase , and INH-NADH adduct formation activities. **Protein Science**, v. 19, p. 458-474, 2010.
- CAMINERO, J. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. **European Respiratory Journal**, v. 26, n. 2, p. 339-350, 2005.
- CAMPBELL, P. J.; MORLOCK, G. P.; SIKES, R. D. *et al.* Molecular Detection of Mutations Associated with First- and Second-Line Drug Resistance Compared with Conventional Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2032-2041, 2011.
- CAPONE, D. PATOGENIA E IMUNOLOGIA. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**, v. 5, p. 27-34, 2006.
- CARDOSO, R. F.; CARDOSO, M. A.; LEITE, C. Q. F. *et al.* Characterization of ndh gene of isoniazid resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 59-61, fev 2007.
- CARDOSO, R. F.; COOKSEY, R. C.; MORLOCK, G. P. *et al.* Screening and Characterization of Mutations in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3373-3381, 2004.
- CASTELO, A.; MEDICINA, E. P. D.; ESP, U. N. I. II Consenso Brasileiro de Tuberculose Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 1, p. 1-56, 2004.
- CATTAMANCHI, A.; DOWDY, D. W.; DAVIS, J. L. *et al.* Sensitivity of direct versus concentrated sputum smear microscopy tuberculosis. v. 5, p. 1-9, [S.d.].
- CAVIEDES, L.; LEE, T.-SHUN; GILMAN, R. H. *et al.* Rapid , Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum by Microscopic Observation of Broth Cultures Rapid , Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum by Microsc. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1203-1208, 2000.
- CAVUSOGLU, C.; TURHAN, A.; AKINCI, P.; SOYLER, I. Evaluation of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2338-42, jul 2006.
- CHAGAS, M.; SILVA, R. M.; BAZZO, M. L.; SANTOS, J. I. The use of polymerase chain reaction for early diagnosis of tuberculosis in *Mycobacterium tuberculosis* culture The use of

polymerase chain reaction for early diagnosis of tuberculosis in *Mycobacterium tuberculosis* culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. June, p. 543-548, 2010.

CHAVES F, ALONSO-SANZ M, REBOLLO MJ, TERCERO JC, JIMENEZ MS, N. A. rpoB mutations as an epidemiologic marker in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **int j tuberc lung dis**, v. 4, n. 8, p. 765-70, 2000.

CHEN, L.; GAN, X.; LI, N. *et al.* rpoB gene mutation profile in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guizhou, one of the highest incidence rate regions in China. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1299-301, jun 2010.

CHO, E. H.; BAE, H. K.; KANG, S. K.; LEE, E. H. Detection of Isoniazid and Rifampicin Resistance by Sequencing of katG, inhA, and rpoB Genes in Korea. **Clinical Microbiology**, v. 29, p. 455-460, 2009.

COHEN, T. E. D.; BECERRA, M. C.; MURRAY, M. B. NIH Public Access. **microbial drug resistance**, v. 10, n. 4, p. 280-285, 2009.

COHEN, T.; SOMMERS, B.; MURRAY, M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 1, p. 13-21, jan 2003.

COLL, P.; ARAGÓN, L. M.; ALCAIDE, F. *et al.* Molecular Analysis of Isoniazid and Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Recovered from Barcelona. **microbial drug resistance**, v. 11, n. 2, p. 1-8, 2005.

CORADOS, E.; MÉTODO, P.; EELSEN, D. E. Z. I. *et al.* of Ziehl-Neelsen staining. **Caderno de saúde coletiva do Rio de Janeiro**, v. 15, n. 3, p. 401-414, 2007.

CRISTINA, M.; IGNEZ, D.-SANTOS J. Evaluation of polymerase chain reaction in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in indigenous and non-indigenous patients. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. October 2005, p. 234-240, 2006.

CRUDU, V.; STRATAN, E.; ROMANCENCO, E.; HILLEMANN, A.; MORARU, N. First Evaluation of an Improved Assay for Molecular Genetic Detection of Tuberculosis as Well as Rifampin and Isoniazid. **journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1264, 2012.

DALLA COSTA, E. R.; RIBEIRO, M. O.; SILVA, MÁRCIA S N; *et al.* Correlations of mutations in katG, oxyR-ahpC and inhA genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. **BMC microbiology**, v. 9, p. 39, jan 2009.

DANIEL, T. M. The history of Tuberculosis. **Respiratory medicine**, v. 100, p. 1862-1870, 2006.

DAVIS, J. M. The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection. **The cell**, v. 136, n. 1, p. 37-49, 2011.

DEUN, A. V.; BARRERA, L.; BASTIAN, I. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* Strains with Highly Discordant Rifampin Susceptibility Test Results. **journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3501-3506, 2009.

DIJL, V.; HAVEN, N.; SWEET, R. M.; MOSIMANN, S.; MEDICAL, B. C. Reconciling the spectrum of *Sagittarius A** with a two-temperature plasma model. **Nature**, v. 396, n. NOVEMBER, p. 1-27, 1998.

DONOGHUE, H. D.; SPIGELMAN, M.; GREENBLATT, C. L. *et al.* Review Tuberculosis and ancient DNA Tuberculosis : from prehistory to Robert Koch , as revealed by ancient DNA. v. 4, n. September, p. 584-592, 2004.

DOORN, H. R. VAN; HAAS, P. E. W. DE; KREMER, K; *et al.* 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 : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 769-75, ago 2006.

DORMAN, S. E.; CHIHOTA, V. N.; LEWIS, J. J. *et al.* Performance Characteristics of the Cepheid Xpert MTB/RIF Test in a Tuberculosis Prevalence Survey. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e43307, jan 2012.

E. K. SCHROEDER. Drugs that Inhibit Mycolic Acid Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 197-225, 2010.

FATTORINI, L.; IONA, E.; CIRILLO, D. *et al.* External quality control of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing : results of two rounds in endemic countries. **int j tuberc lung dis**, v. 12, n. October 2007, p. 214-217, 2008.

FILLIOL, I.; MOTIWALA, A. S.; CAVATORE, M. *et al.* Global Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis : Insights into Tuberculosis Evolution , Phylogenetic Accuracy of Other DNA Fingerprinting Systems , and Recommendations for a Minimal Standard SNP Set. **Journal of Bacteriology**, v. 18, n. 2, p. 1-17, 2006.

GAGNEUX, S. A role for systems epidemiology in tuberculosis research. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 10, p. 492-500, 2011.

GANDHI, N. R.; MOLL, A.; STURM, A. W. *et al.* Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 119, n. 06, p. 1575-1580, 2006.

GILL, S. K.; GARCIA, G. A. Rifamycin inhibition of WT and Rif-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli* RNA polymerases in vitro. **Tuberculosis**, v. 91, n. 5, p. 361-369, 2011.

GROSSET, J.; LOUNIS, N.; TRUFFOT-PERNOT, C. *et al.* Once-weekly Rifapentine-containing Regimens for Treatment of Tuberculosis in Mice. **j respir crit care med**, v. 157, p. 1436-1440, 1998.

GUTACKER, M. M.; MATHEMA, B.; SOINI, H. *et al.* Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 1, p. 121-8, 1 jan 2006.

HANG, H. Z.; UN, Z.-G S.; ENG, J.-Y D. *et al.* Mutations Found in the *pncA* Gene of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Pyrazinamide-resistant Isolates from a Local Region of China. **The Journal of International Medical Research**, v. 37, p. 1430-1435, 2009.

HEEP, M.; BRANDSTÄTTER, B.; RIEGER, U. *et al.* Frequency of *rpoB* Mutations Inside and Outside the Cluster I Region in Rifampin-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Frequency of *rpoB* Mutations Inside and Outside the Cluster I Region in Rifampin-Resistant Clinical *Mycobacterium tubercu.* **journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 1, p. 107-110, 2001.

HEIFETS, L. B.; CANGELOSI, G. A. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: a neglected problem at the turn of the century. **The international journal of tuberculosis and lung disease** : t, v. 3, n. 7, p. 564-81, jul 1999.

HELB, D.; JONES, M.; STORY, E. *et al.* Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Rifampin Resistance by Use of On-Demand , Near-Patient Technology Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Rifampin Resistance by Use of On-Demand , Near-Patient Technology †‡. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 1, p. 229-237, 2010.

HIJJAR, M. A. Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 1, p. 50-58, 2007.

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 Use of the Genotype MTBDR Assay for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis.* **journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 8, p. 1-6, 2005.

HONSCHA, G.; GROLL, A. V.; VALENÇA, M. *et al.* The laboratory as a tool to qualify tuberculosis diagnosis. **int j tuberc lung dis**, v. 12, n. April 2007, p. 218-220, 2008.

IGOR, M.; OLGA, N. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant. **Chinese Medical Journal**, v. 120, n. 30471841, p. 814-819, 2007.

IOANNIDIS, P.; PAPAVENTSIS, D.; KARABELA, S. *et al.* Cepheid GeneXpert MTB / RIF Assay for *Mycobacterium tuberculosis*. Detection and Rifampin Resistance Identification in Patients with Substantial Clinical Indications of Tuberculosis and Smear-Negative Microscopy Results. **journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3068-3070, 2011.

JA., C. Management of multidrug-resistant tuberculosis and patients in retreatment. **The European Respiratory Journal**, v. 25, n. 5, p. 928-36, 2005.

JIA, K.; YU, M.; ZHANG, G.-HONG; *et al.* Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. **Journal of Veterinary Diagnostic**, v. 24, n. 1, p. 156-160, 2012.

JOHN, O. Z. S. C. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis.* **Nature**, v. 6, n. 8, p. 1043-1047, 2000.

KALANTRI, S.; PAI, MADHUKAR; PASCOPELLA, L.; RILEY, L.; REINGOLD, A. Bacteriophage- based tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens : a systematic review and meta- analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 1-13, 2005.

KAPUR, V.; WHITTAM, T. S.; MUSSER, J. M. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 Years Old? **Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 5, p. 1348-1349, 1 nov 1994.

KARAKOUSIS, P. C. Mechanisms of Action and Resistance of Antimycobacterial Agents. **Antimicrobial Drug Resistance**. [S.l: s.n.], 2009. p. 1-21.

KAREN R STEINGART, VIVIENNE NG MPH , MEGAN HENRY MPH ,PROF PHILIP C HOPEWELL , ANDREW RAMSAY , JANE CUNNINGHAM E, RICHARD URBANCZIK , MARK D PERKINS , MOHAMED ABDEL AZIZ, M. P. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 10, p. 664-674, 2006.

KIEPIELA, P.; BISHOP, K. S.; SMITH, A. N.; ROUX, L.; YORK, D. F. Genomic mutations in the *katG*, *inhA* and *aphC* genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kwazulu Natal, South Africa. **Tubercle and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 80, n. 1, p. 47-56, jan 2000.

KONTOS, F.; PETINAKI, E.; GITTI, Z. *et al.* Combined use of the fully automated Bactec MGIT 960 System and a PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for routine detection and identification of mycobacteria from clinical samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 137-140, 2003.

KORBEL, D. S.; SCHNEIDER, B. E.; SCHAIBLE, U. E. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 9, p. 995-1004, 2008.

LAURENZO, D.; MOUSA, S. A. Acta Tropica Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic testing. **Acta Tropica**, v. 119, n. 1, p. 5-10, 2011.

LEE, A. S. G.; NOOR, S.; OTHMAN, K.; HO, Y. M.; WONG, S. Y. ET AL. Novel Mutations within the *embB* Gene in Ethambutol-Susceptible Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4447-4449, 2004.

LEE, A. S. G.; TANG, L. L. H.; LIM, I. H. K.; BELLAMY, R.; WONG, S.-Y. Discrimination of single-copy IS6110 DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by high-resolution minisatellite-based typing. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 657-9, fev 2002.

LI, J.; XIN, J.; ZHANG, L. *et al.* Rapid Detection of *rpoB* Mutations in Rifampin Resistant *M. tuberculosis* from Sputum Samples by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 6, p. 148-156, 2012.

LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. 2012.

LING, D. I.; ZWERLING, A. A.; PAI, M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. **European Respiratory Journal**, v. 32, n. 5, p. 1165-1174, 2008.

LOCHT, C.; ROUANET, C.; HOUGARDY, J.-M.; MASCART, F. How a different look at latency can help to develop novel diagnostics and vaccines against tuberculosis. **Expert opinion on biological therapy**, v. 7, n. 11, p. 1665-77, nov 2007.

MALHOTRA, S.; COOK, V. J.; WOLFE, J. N. *et al.* A mutation in *Mycobacterium tuberculosis* rpoB gene confers rifampin resistance in three HIV-TB cases. **Tuberculosis**, v. 90, n. 2, p. 152-157, 2010.

MARTIN, A.; TAKIFF, H.; VANDAMME, P.; SWINGS, J.; PALOMINO, J. C. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. June, p. 327-331, 2006.

MAYER, K. H. Synergistic Pandemics: Confronting the Global HIV and Tuberculosis Epidemics. **Oxford Journals**, v. 50, n. Suppl 3, p. 67-70, 2010.

MC RAVIGLIONE. Evolution of WHO policies for tuberculosis control, 1948—2001. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 359, n. 9308, p. 775-780, 2002.

MCCAMMON, M. T.; GILLETTE, J. S.; THOMAS, D. P. *et al.* Detection of rpoB Mutations Associated with Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2200-2209, 2005.

MCGEE, P. **Morbidity and Mortality Weekly Report Guidelines for Preventing the Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Health-Care Settings**. [S.l: s.n.], 2005. v. 54p. 1-144

MICHELON, C. T.; ROSSO, F.; SCHMID, K. B. *et al.* Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. March, p. 194-199, 2011.

MIKUSOVA, K., R. A. S. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 11, p. 2484-2489., 1995.

MITCHISON, D. A. (1985). The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. **Tubercle**, v. 66, n. 3, p. 219-225, 1985.

MORITA, Y. S.; PATTERSON, J. H.; BILLMAN-JACOB, H.; CONVILLE, M. J. M. C. Biosynthesis of mycobacterial phosphatidylinositol mannosides. **Biochemical Journal**, v. 597, p. 589-597, 2004.

NAPOCA, C.; DANIELLO, L. Surgical treatment to increase the success rate of multidrug-resistant tuberculosis. **European journal of cardio-Thoracic surgery**, v. 0, p. 1-4, 2012.

PADMAPRIYADARSINI, C.; NARENDRAN, G.; SWAMINATHAN, S. Diagnosis & treatment of tuberculosis in HIV co-infected patients. **Indian J Med Res**, n. December, p. 850-865, 2011.

PALOMINO, J. C. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. **Imunological Medical microbiology**, v. 2, p. 1-9, 2009.

PALOMINO, LEÃO, R. **Tuberculosis**. [S.l: s.n.], 2007. p. 1-687

PAREEK, C. S.; SMO CZYNSKI, R. Sequencing technologies and genome sequencing. **J Appl Genetics**, v. 52, p. 413-435, 2011.

PEREIRA, S. M. BCG vaccine against tuberculosis : its protective. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, p. 1-7, 2007.

PERKINS, M. D.; CUNNINGHAM, J. Facing the crisis: improving the diagnosis of tuberculosis in the HIV era. **The Journal of infectious diseases**, v. 196 Suppl, p. S15-27, 15 ago 2007.

PETER A. SELWYN, PHILIP ALCABES, D. H. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at UFRGS on July 11, 2012. For personal use only. No other uses without permission. Copyright © 1992 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 24, p. 1-7, 1992.

PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C. Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Samples MINIREVIEW Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Sa. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5355-5365, 2003.

PIETERS, J. Review *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage : Maintaining a Balance. n. June, p. 399-407, 2008.

PRASAD, R. Multidrug and extensively drug - resistant tuberculosis management : Evidences and controversies. **Lung India**, v. 29, n. 2, p. 154-159, 2012.

RAMASWAMY S, M. J. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. **Tubercle and lung disease**, v. 79, n. 1, p. 3-29, 1998.

RAMASWAMY, S.; MUSSER, J M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. **Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 79, n. 1, p. 3-29, jan 1998.

RAVIGLIONE MC. Evolution of WHO policies for tuberculosis contro. **Lancet**, v. 359, p. 755-780, 2002.

REECE, S. T.; KAUFMANN, S. H. E. Floating between the poles of pathology and protection : can we pin down the granuloma in tuberculosis ? **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 63-70, 2012.

RICHARD, J.; SANTOS, S.; VIANNA, S. M. **medindo as desigualdades em saúde no brasil**. [S.l: s.n.], 2001. p. 1-223

ROBITZEK EH, S. I. Hydrazine derivatives of isonicotinic acid (rimifon marsilid) in the treatment of active progressive caseous-pneumonic tuberculosis; a preliminary report. **American review of tuberculosis**, v. 65, n. 4, p. 402-28, 1952.

RODRIGUES, LAURA; KRAMER, M.; BARATA, R. D. C. B. Brazilian response to tuberculosis : context ,. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 1, p. 2007, 2007.

RODRIGUES, LILIANA; MACHADO, D.; COUTO, I.; AMARAL, L.; VIVEIROS, M. Infection , Genetics and Evolution Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the

Mycobacterium tuberculosis complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 695-700, 2012.

ROSSETTI, R.; ROSANE, A.; VALIM, D. M.; SUSANA, M.; SILVA, N. Tuberculose resistente : revisão molecular Resistant tuberculosis : a molecular review. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 4, p. 525-532, 2002.

ROUSE, D. A. Site-directed mutagenesis of the katG gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase–peroxidase activities and isoniazid resistance. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 583-592, 2003.

ROUSE DA, DEVITO JA, LI Z, BYER H, M. S. Site-directed mutagenesis of the katG gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. **Molecular microbiology**, v. 22, n. 3, p. 583-592, 1996.

RYLANCE, J.; PAI, MADHUKAR; LIENHARDT, C.; GARNER, P. Priorities for tuberculosis research : a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 886-892, 2010.

S PRAKASH, SK KATIYAR, S PURWAR, J. S. CLINICAL EVALUATION OF THE MYCOBACTERIOPHAGE-BASED ASSAY IN RAPID DETECTION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, p. 134-138, 2009.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. *et al.* Enzymatic Amplification of α -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science**, v. 230, p. 1-5, 1985.

SCORPIO, A.; LINDHOLM-LEVY, P.; HEIFETS, L. *et al.* Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* . Characterization of pncA Mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 1-5, 1997.

SEKIGUCHI, J.-ICHIRO; MIYOSHI-AKIYAMA, T. Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 1, p. 179-192, 2007.

SEKIGUCHI, J.-ICHIRO; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; ZWOLSKA, Z. *et al.* Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* . **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 1, p. 179-192, 2007.

SILAIGWANA, B.; GREEN, E.; NDIP, R. N. Molecular Detection and Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Cattle at a Dairy Farm in the Nkonkobe Region of South Africa : A Pilot Study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, p. 2045-2056, 2012.

SILVA, MÁRCIA SUSANA N; SENNA, S. G.; RIBEIRO, M. O. *et al.* Mutations in katG , inhA , and ahpC Genes of Brazilian Isoniazid-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Isoniazid-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 9, p. 1-5, 2003.

SIMONNET, C. Automated Extraction and Amplification for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Various. v. 49, n. 4, p. 1700-1701, 2011.

- SIMONS, S. O.; SOOLINGEN, D. VAN. Drug susceptibility testing for optimizing tuberculosis treatment. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 27, p. 2863-74, jan 2011.
- SIQUEIRA, H. R. D.; ALVIM, F.; FREITAS, D. D.; OLIVEIRA, D. N. D. Original Article. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. October 2008, p. 773-779, 2009.
- SLAYDEN, R. A.; BARRY, C. E. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 4, p. 659-669, 2000.
- SMALL, P. M.; PAI, MADHUKAR; PH, D. edi t or i a l s Tuberculosis Diagnosis — Time for a Game Change. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 11, p. 1-2, 2010.
- SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. **Clinical Microbiology reviews**, v. 16, n. 3, 2003.
- SMITH, N. H.; DALE, J.; INWALD, J. *et al.* The population structure of *Mycobacterium bovis* in Great Britain: clonal expansion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 25, p. 15271-5, 9 dez 2003.
- SMITH, N. H.; HEWINSON, R. G.; KREMER, KRISTIN; BROSCHE, ROLAND; GORDON, STEPHEN V. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Publishing Group**, v. 7, n. 7, p. 537-544, 2009.
- SPIES, F. S.; ALMEIDA, P. E.; RIBEIRO, M. O.; ROSSETTI, M. L.; ZAHA, A. Identification of Mutations Related to Streptomycin Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and Possible Involvement of Efflux Mechanism †. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2947-2949, 2008.
- SRIVASTAVA, K.; DAS, R.; JAKHMOLA, P. *et al.* Correlation of mutations detected by INNO-LiPA with levels of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Indian J Med Res**, v. 100, n. August, p. 100-105, 2004.
- SUCHINDRAN, S.; BROUWER, E. S.; RIE, A. V. Is HIV Infection a Risk Factor for Multi-Drug Resistant Tuberculosis ? A Systematic Review. **plos one**, v. 4, n. 5, p. 1-9, 2009.
- SURVEILLANCE, D. R. **World Health Organization**. . [S.l: s.n.]. , 2000
- SYRE, H.; KROSS, M.; STAVRUM, R.; TI, T.; PHYU, S. Isoniazid and rifampicin resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Yangon , Myanmar : implications for rapid molecular testing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. August, p. 694-701, 2009.
- TAKAYAMA, K.; ARMSTRONG, I. E. L.; KUNUGI, K. A.; KILBURN, J. Ethambutol of Mycolic. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 16, n. 2, p. 240-242, 1979.
- TAKAYAMA, K.; KILBURN, J. Inhibition of Synthesis of Arabinogalactan by Ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 33, n. 9, p. 1493-1499, 1989.

TENOVER, F. C.; CRAWFORD, J. T.; HUEBNER, R. E. *et al.* GUEST COMMENTARY The Resurgence of Tuberculosis: Is Your Laboratory Ready? **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 31, n. 4, p. 767-770, 1993.

THE, F.; TB, S.; BOARD, C. Evaluation Stop TB Partners' Forum. **Stop TB Partners' Forum**, n. 10, 2001.

TIANYU ZHANG, SI-YANG LI, KATHY N. WILLIAMS, K. A. Short-Course Chemotherapy with TMC207 and Rifapentine in a Murine Model of Latent Tuberculosis Infection. **J. Respir. Crit. Care Med**, v. 184, p. 732-737, 2011.

TM, S. Mycobacterial taxonomy. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 13, n. 11, p. 884-901, 1994.

UNIT, M. R.; HEALTH, P.; HOSPITAL, D.; GROVE, E. D. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* - a molecular story. **J. Med. Microbio**, v. 47, p. 189-196, 1998.

VIEDMA, D. G. D.; DÍAZ, S.; CHAVES, F. *et al.* New Real-Time PCR Able To Detect in a Single Tube Multiple Rifampin Resistance Mutations and High-Level Isoniazid Resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* New Real-Time PCR Able To Detect in a Single Tube Multiple Rifampin Resistance Mutations a. **journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 3, p. 1-9, 2002.

VILCH, C.; JACOBS, W. R. The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics. **The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics**, v. 61, p. 35-50, 2007.

VINÍCIUS, M.; SOUZA, N. D. ET AL. Promising Drugs Against Tuberculosis. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, n. Table 5, p. 33-44, 2006.

VITORIA, N.; RUBIO, M. C.; MARTI, C.; MICROBIOLOGI, D. D. Use of a PCR Method Based on IS6110 Polymorphism for Typing *Mycobacterium tuberculosis* Strains from BACTEC Cultures. **journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 1, p. 273-277, 1997.

WAI, W.; MIGLIORI, G. B.; LANGE, C. INVITED REVIEW SERIES: TUBERCULOSIS. **Respirology**, v. 15, p. 220-240, 2010.

WALZL, G.; RONACHER, K.; HANEKOM, W.; SCRIBA, T. J. Immunological biomarkers of tuberculosis. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 5, p. 343-354, 2011.

WATTERSON, S. A.; WILSON, S. M.; YATES, M. D.; DROBNIIEWSKI, F. A.; ICROBIOL, J. C. L. I. N. M. Comparison of Three Molecular Assays for Rapid Detection of Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1969-1973, 1998.

WHO. ANTI-TUBERCULOSIS DRUG RESISTANCE in the world. **Wold Health Organization**, n. 4, p. 1-142, 2008a.

WHO. Global Tuberculosis Control. **Report WHO**, v. 1, n. 1, p. 1-87, 2009.

WHO. **TUBERCULOSIS. Global Tuberculosis Control**. [S.l: s.n.], 2011a

WHO. Global , regional and country-specific data for key indicators. **Organização Mundial da Saúde**, v. 3, p. 1-136, 2011b.

WHO. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB). **global report on surveillance and response**, v. 1, p. 71, 2011c.

WHO. “ Totally Drug-Resistant TB ”: a WHO consultation on the diagnostic definition and treatment options. **World Health Organization**, n. March, p. 21-22, 2012.

WHO, 2008. **Report of the second meeting of the WHO Task Force on XDR-TB**. . [S.l: s.n.]. , 2008b

WILLIAMS-BOUYER N, YORKE R, LEE HI, W. G. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP cultures system II for growth and detection of mycobacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 11, p. 4167-4170, 2000.

YANG, S. Rapid detection of rpoB and katG genes from the sputum of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction (PCR)-direct sequencing analysis. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 26, 16 nov 2011.

YAO, C.; ZHU, T.; LI, Y. *et al.* Detection of rpoB , katG and inhA gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Chongqing as determined by microarray. **Bacteriology**, v. 16, p. 1639-1643, 2010.

YEAGER, R. L., W. G. M. Pyrazinamide (aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis." 65(5): 523-546. **Am Rev Tuberc**, v. 65, n. 5, p. 523 - 546, 1952.

YOUNG, D. B.; PERKINS, M. D.; DUNCAN, K.; BARRY, C. E. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1255-65, abr 2008.

ZAGER, E. M.; MCNERNEY, R. Multidrug-resistant tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, p. 1-5, 2008.

ZARIR F. UDWADIA. Clinical Infectious Diseases Advance Access published December 21, 2011. **Clinical Infectious Diseases**, v. 0, p. 15-16, 2011.

ZHANG, M.; YUE, J.; YANG, Y.-PING; *et al.* Detection of Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China Detection of Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China. **Jour**, v. 43, n. 11, p. 1-7, 2005.

ZHANG, N.; TORRELLES, J. B.; MCNEIL, M. R. *et al.* The Emb proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via an N-terminal recognition region and a C-terminal synthetic region. v. 50, p. 69-76, 2003.

ZHANG, Y; YEW, W. W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **The international journal of tuberculosis and lung disease**, v. 13, n. 11, p. 1320-1330, 2009.

ZHANG, YING; WADE, M. M.; SCORPIO, A.; ZHANG, H.; SUN, Z. Mode of action of pyrazinamide : disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 790-795, 2003.

