

**MARIA GISELE GONÇALVES**

**Perfil mutacional dos genes responsáveis pela  
resistência de *Mycobacterium tuberculosis* a  
rifampicina (*rpoB*) e isoniazida (*katG* e *inhA*) em  
cepas isoladas no Estado de São Paulo e avaliação  
do uso da PCR em tempo real para a detecção rápida  
destas mutações**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração:**

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

**Orientador:**

Prof. Dr. Cláudio Tavares Sacchi

**SÃO PAULO**

**2011**

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Gonçalves, Maria Gisele

Perfil mutacional dos genes responsáveis pela resistência de *Mycobacterium tuberculosis* a rifampicina (*rpoB*) e isonizida (*katG* e *inhA*) em cepas isoladas no Estado de São Paulo e avaliação do uso da PCR em tempo real para a detecção rápida destas mutações / Maria Gisele Gonçalves. São Paulo, 2011.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Cláudio Tavares Sacchi

1. Tuberculose resistente à múltiplos medicamentos
2. Rifampina
3. Isoniazida
4. Genes MDR
5. Reação em cadeia da polimerase

SES/CCD/CD-251/11

## **Dedicatória**

***À Maria Benedita Macedo***

***minha mãe, meu exemplo, minha força divina, que:***

*“...Fez: o cansaço virar coisa pouca,*

*a decência ser prato do dia,*

*a tristeza o remédio pra sonhar*

*Ah! Foi você quem me mostrou o caminho*

*Que apostou tudo no pergaminho...”*

*(Nelson Gonçalves)*

***E aos 7 filhos de Maria...***

*Exemplos de luta, perseverança e dignidade.*

## Agradecimentos

À Dr. Glavur Matte e Dra. Maria Helena Matte pela assistência na elaboração inicial deste estudo.

Ao Núcleo de Tuberculose e Micobacteriose - Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, em especial à **Rosângela Siqueira de Oliveira** pelos ensinamentos e pela coordenação do teste fenotípico de susceptibilidade às drogas e Fábio Oliveira Latrilha pela realização desses testes.

À Marcílio Figueiredo Lemos pela assistência técnica na realização do sequenciamento de DNA.

À Felipe de Souza Gualberto pela disponibilidade e ensinamentos clínicos de TB.

À Kathleen A Shutt pela assistência estatística.

À **Lucila Okuyama Fukasawa** pela colaboração e assistência no desenvolvimento das técnicas moleculares.

À equipe do Laboratório de Diagnóstico Molecular de Infecções Bacterianas: **Cláudio Tavares Sacchi**, pelos ensinamentos, cobranças de aprendizado, incentivo e oportunidade; **Maristela Marques Salgado** pelos ensinamentos profissionais e literários no decorrer deste percurso; **Fábio Takenori Higa**, Terezinha Pereira de Araújo e Anna Vera Custódio pelo incentivo, apoio e carinho. E a todos do **grupo**, que se sobrecarregaram diariamente para permitir a minha ausência durante as realizações dos cursos, não posso deixar de registrar meu: **MUITO OBRIGADO!**

À Jaques Franco (FUNDAP) pela colaboração na execução dos infinitos géis (eletroforese) e purificações.

À todos os funcionários da Seção de Imunologia pela amizade, profissionalismo e Adriana Pardini Vicentini pela acolhida e disponibilidade.

À Emmanuela Avelar Silva Costa, Angela Noronha Passos, Daniela Leite, pelo apoio e incentivo estudantil.

À Nilva Matias dos Reis pela amizade incondicional, apoio e desprendimento.

À Rafael Luiz da Silva (marido) e Henry Gonçalves Silva (filho): por estarem presentes em todos os momentos, escalam comigo degrau a degrau e me apoiarem nas quedas, por ficarem felizes quando me veem contente e pelos olhares constantes que dizem: Vá em frente, estaremos sempre ao seu lado!

## **Agradecimentos**

**Trabalho realizado no Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo/SP da Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo.**

Este trabalho teve o Apoio Financeiro do:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): 573830/2008-8.
- Fogarty International Center Global Infectious Diseases Research Training Program grant, National Institutes of Health, to the University of Pittsburgh (D43TW006592), em nome do Dr. Lee H Harrison, do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (K24 AI52788).

**Gonçalves MG. Perfil mutacional dos genes responsáveis pela resistência de *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina (*rpoB*) e isoniazida (*katG* e *inhA*) em cepas isoladas no Estado de São Paulo e avaliação do uso da PCR em tempo real para a detecção rápida destas mutações.**

## **RESUMO**

INTRODUÇÃO. A detecção rápida de isolados resistentes contribui para prevenir a transmissão e orientar na escolha inicial das drogas para o tratamento da tuberculose. A PCR em tempo real (RT-PCR) detecta todas as mutações do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) que ocorrem na região de 81pb do gene *rpoB*, códon 315 do *katG* e sítio de ligação ribossomal *inhA*, responsáveis pela resistência à rifampicina (RIF) e isoniazida (INH), respectivamente. OBJETIVO. O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade, especificidade e rapidez do método de RT-PCR em determinar a susceptibilidade de isolados de MTB à RIF e INH em comparação ao método tradicional de susceptibilidade às drogas. MATERIAL E MÉTODOS. Foram analisados 988 isolados de MTB do Estado de São Paulo, o método BACTEC™MGIT™ 960 foi utilizado como padrão de referência para os testes de susceptibilidade às drogas. Na RT-PCR a susceptibilidade à INH e/ou RIF foi determinada pelo padrão de reatividade de diferentes sondas para regiões específicas dos genes *katG* e *inhA* e *rpoB*, respectivamente. O sequenciamento dos fragmentos dos genes amplificados foi utilizado como contraprova. RESULTADOS. A sensibilidade da RT-PCR na detecção de resistência à INH pelos genes *katG* e *inhA*, individualmente, foram de 55% e 25%, respectivamente e 73% quando combinadas; e para a RIF foi de 99%. A especificidade para ambos os testes foi de 100%. Todas as mutações no gene *katG* foram no códon 315 e 87% das mutações no sítio de ligação ribossomal *inhA* foram na

posição -15. A maioria das mutações no gene *rpoB* ocorreram nos códons 531 (68%) seguidos pelo códon 526 (23%). CONCLUSÃO. Nossos resultados confirmam que a RT-PCR pode detectar a resistência à RIF e INH em menos de 4 horas com alta sensibilidade. O perfil mutacional dos isolados analisados foi similar aos descritos na literatura.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, PCR em tempo real (RT-PCR); resistência às drogas.

**Gonçalves, M.G. Mutational profile of genes responsible for *Mycobacterium tuberculosis* resistance to rifampicin (*rpoB*) and isoniazid (*katG* and *inhA*) in strains isolated from the São Paulo State and evaluation of the use of real-time PCR for rapid detection of these mutations.**

## **ABSTRACT**

INTRODUCTION. Rapid detection of resistant strains is important for preventing the transmission and directing the initial choice of drugs for tuberculosis treatment. Real-time (RT)-PCR assays can detect all mutations that occur in the *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) 81bp-core region of *rpoB* gene, codon 315 of the *katG* gene and *inhA* ribosomal binding site, responsible for resistance to rifampin (RIF) and isoniazid (INH), respectively.

OBJECTIVE. The aim of this study was to compare the performance of RT-PCR versus the traditional culture-based method to determine RIF and INH drug-susceptibility on MTB isolates.

MATERIAL AND METHODS. Nine hundred eighty-eight MTB isolates from São Paulo State were analyzed and the BACTEC™ MGIT™ 960 was used as the gold standard method for drug-susceptibility testing. The susceptibility to RIF and/or INH was determined by RT-PCR pattern of reactivity of different probes for specific regions of *katG*, *inhA*, and *rpoB* genes, respectively. The sequencing was used to confirm the results.

RESULTS. The sensitivity of RT-PCR in detecting INH resistance by genes *katG* and *inhA* individually were 55% and 25%, respectively, and 73%



when combined; and 99% to detect RIF-resistance. The specificity for both PCRs was 100%. All mutations of *katG* gene were at codon 315 and 87% of the mutations in the *inhA* ribosomal binding site was at -15 position. The most frequently mutated codons of *rpoB* gene was 531 (68%) followed by codon 526 (23%). CONCLUSION. Our results confirm that RT-PCR can detect INH and RIF resistance in less than 4 hours with high sensitivity. The mutation profiles of the isolates analyzed were similar to those described in the literature.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*; real time PCR (RT-PCR); drug-resistance.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>AIDS</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida
<b>am</b>	Amostra biológica
<b><i>apud</i></b>	Ver em de acordo com
<b>et al.</b>	Em conjunto com
<b>BAAR</b>	Bacilo-álcool-ácido-resistente
<b>BCG</b>	Bacilo de Calmet-Guerin
<b>BHQ1</b>	<i>Black Hole Quencher 1</i>
<b>C</b>	Citosina
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>CCD</b>	Coordenadoria de Controle de Doenças
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>D</b>	Ácido aspártico
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DNAse</b>	Enzima catalisadora de ácido desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	Desoxitriucleotídeo trifosfatado
<b>dATP</b>	Desoxiadenosina trifosfatado

<b>dCTP</b>	Desoxicitosina trifosfatado
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosina trifosfatado
<b>dTTP</b>	Desoxitimidina trifosfatado
<b>DOTS</b>	Estratégia de tratamento diretamente observado
<b>E</b>	Etambutol ou Ácido glutâmico
<b>E cols</b>	E colaboradores
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>F</b>	Fenilalanina
<b>FAM</b>	6-carboxyfluorescein
<b>G</b>	Guanina ou Glicina
<b>g</b>	Gramas
<b>H</b>	Histidina
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HEX</b>	<i>4,7,2',4',7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein</i>
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana adquirida
<b>I</b>	Isoleucina
<b>INH</b>	Isoniazida
<b><i>inhA</i></b>	Enoil-ACP-redutase
<b>K</b>	Lisina
<b><i>katG</i></b>	Catalase-peroxidase

<b>Kb</b>	Kilobases
<b>L</b>	Leucina ou Litros
<b>LJ</b>	Lowenstein-Jensen
<b>M</b>	Molar ou Metionina
<b>MDR</b>	Multi-drogras-resistente
<b>mg</b>	Miligramas
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>min</b>	Minuto
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>MT</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>mL</b>	Mililitros (10 <sup>-3</sup> Litros)
<b>mM</b>	Milimolar (10 <sup>-3</sup> Molar)
<b>N</b>	Aspargina
<b>ng</b>	Nanogramas (10 <sup>-9</sup> gramas)
<b>nm</b>	Nanômetro (10 <sup>-9</sup> metro)
<b>nM</b>	NanoMolar(10 <sup>-9</sup> Molar)
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde

<b>P</b>	Prolina
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Solução salina-fosfatada tamponada
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>pMolar</b>	PicoMolar ( $10^{-12}$ Molar)
<b>PNB</b>	Ácido-p-nitrobenzóico
<b><i>Pzase</i></b>	Pirazinamidase
<b>Q</b>	Glutamina
<b>qsp</b>	Quantidade suficiente para
<b>R</b>	Arginina
<b>RIF</b>	Rifampicina
<b><i>rpoB</i></b>	Subunidade beta ( $\beta$ ) da RNA polimerase
<b>RT-PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
<b>S</b>	Serina ou Streptomomicina
<b>seg</b>	Segundos
<b>T</b>	Timina ou Treonina
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>TBE</b>	Tris-borato-EDTA

<b>Tris</b>	Tris-hidroximetil-aminometano
<b>Tris-HCl</b>	Tris-hidroximetil-aminometano - Ácido clorídrico
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>U</b>	Unidade
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>µg</b>	Micrograma ( $10^{-6}$ Gramas)
<b>µL</b>	Microlito ( $10^{-6}$ Litro)
<b>µM</b>	Micromolar ( $10^{-6}$ Molar)
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>V</b>	Valina
<b>v/v</b>	Volume/volume
<b>volts</b>	Voltagem
<b>W</b>	Triptofano
<b>XDR</b>	Drogas super ou extensivamente resistentes
<b>Y</b>	Tirosina
<b>Z</b>	Pirazinamida

## Lista de Figuras

Figura 1- Aspectos da morfologia do <i>M. tuberculosis</i> .....	23
Figura 2- Esquema do granuloma tuberculoso .....	25
Figura 3- Estimativa de incidência de TB/mundo em 2008 .....	28
Figura 4- Estimativa de TB/HIV (casos novos), no mundo em 2008 .....	28
Figura 5- Distribuição mundial de MDR-TB (casos novos), WHO 2010.....	30
Figura 6- Distribuição mundial de MDR-TB entre casos previamente tratados.....	31
Figura 7- Notificação mundial de XDR-TB até janeiro de 2010.....	32
Figura 8- Representação esquemática de 3 químicas para RT-PCR .....	44
Figura 9- Esquema do gene <i>rpoB</i> (códon 507 a 533) .....	54
Figura 10- Plotagem das curvas de amplificação da RT-PCR.....	55
Figura 11- Plotagem de uma curva de fluorescência da RT-PCR.....	56
Figura 12- Esquema dos sítios de mutação para INH-resistentes .....	70
Figura 13- Esquema dos sítios de mutação para RIF-resistentes.....	73

## Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1- Genes mutados e elemento de inserção (IS) de MTB relacionados à resistência as drogas.....	35
Tabela 1- Sequência de iniciadores e sondas para a RT-PCR do complexo MT.....	50
Tabela 2- Iniciadores, sondas, referências bibliográficas, concentrações para RT-PCR, amplificação, sequenciamento dos genes .....	52
Tabela 3- Esquema das concentrações dos oligonucleotídeos ( <i>primers</i> e sondas) .....	57
Tabela 4- Relação dos sítios das amostras submetidas ao isolamento para pesquisa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	63
Tabela 5- Resumo da sensibilidade e resistência obtidas nos 988 isolados através dos métodos Fenotípicos e RT-PCR.....	68
Tabela 6- Mutações gênicas associadas à resistência a INH na TB.....	70
Tabela 7- Mutações gênicas associadas à resistência a RIF na TB.....	72
Tabela 8- Esquema da tabela de contingência (2X2) .....	74
Tabela 9- Sensibilidade e especificidade da RT-PCR para INH (315 do <i>katG</i> ).....	75
Tabela 10- Sensibilidade e especificidade da RT-PCR para INH ( <i>inhA</i> ).....	75
Tabela 11- Sensibilidade e especificidade da RT-PCR para INH ( <i>katG</i> e <i>inhA</i> ) .....	76
Tabela 12- Sensibilidade e especificidade da RT-PCR para RIF ( <i>rpoB</i> ).....	77



## Lista de Gráficos

Gráfico 1- Distribuição do perfil de isolados de MT fenotipicamente resistentes.....	65
Gráfico 2- Distribuição do perfil dos isolados de MT para INH e RIF por RT-PCR .....	66
Gráfico 3- Distribuição genotípica (RT-PCR) de isolado de MT (INH). .....	66
Gráfico 4- Distribuição do perfil dos isolados de MT para RIF por RT-PCR.....	67
Gráfico 5- Distribuição dos resultados obtidos por sequenciamento para INH.....	69
Gráfico 6- Distribuição dos resultados obtidos por sequenciamento para RIF.....	71

## **Lista de Anexos**

Anexo 1- Encaminhamento a Comitê de Ética externo

Anexo 2- Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 3- Análise de custos das reações de RT-PCR e MGIT 960

Anexo 4- Levantamento de resultados de MGIT 960 no primeiro semestre de 2010 (comunicação pessoal Dra Rosângela Siqueira de Oliveira- Centro de Tuberculose e Micobacteriose do Instituto Adolfo Lutz- São Paulo).

## Índice

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
1.1. Classificação, morfologia e doença .....	22
1.2. Breve Histórico .....	26
1.2.1. Do descobrimento a Epidemiologia atual .....	26
1.2.2. Tratamento quimioterápico .....	32
1.3. Mecanismos de Resistência .....	34
1.3.1. Perfil de resistência de <i>M. tuberculosis</i> isolados no Brasil ....	37
1.3.2. Importância do conhecimento das mutações e suas frequências .....	38
1.4. Diagnósticos de Sensibilidade e Resistência às drogas.....	39
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>46</b>
2.1. Geral .....	46
2.2. Específicos .....	46
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
3.1. Área e População de Estudo .....	47
3.2. Definições fenotípicas de resistência .....	47
3.3. Delineamento .....	48
3.4. Preparo das suspensões bacterianas .....	48
3.5. Teste Fenotípico .....	49
3.6. RT-PCR para identificação de <i>M. tuberculosis</i> .....	50

3.7. RT-PCR para detecção de Resistência/Sensibilidade dos isolados .....	51
3.7.1. Análise/Expressão dos resultados .....	54
3.7.2. Concentração dos oligonucleotídeos, ciclagens .....	56
3.8. Amplificação e Sequenciamento .....	59
3.9. Purificações dos produtos de PCR .....	60
3.10. Sequenciamento do DNA .....	60
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
4.1. Sítios de coleta das amostras submetidas ao isolamento .....	62
4.2. Confirmações do complexo <i>M. tuberculosis</i> por RT-PCR .....	64
4.3. Resultados Fenotípicos .....	64
4.3.1. Análise dos perfis de sensibilidade e resistência .....	64
4.4. Determinação genotípica da resistência.....	65
4.4.1. Por RT-PCR (INH e RIF) .....	65
4.4.1.1. RT-PCR para INH .....	66
4.4.1.2. RT-PCR para RIF .....	67
4.4.2. Por sequenciamento .....	68
4.4.2.1. Sequenciamento - Isoniazida .....	68
4.4.2.1.1. Sequenciamento - Gene <i>katG</i> .....	69
4.4.2.1.2. Sequenciamento - Gene <i>inhA</i> .....	70
4.4.2.2. Sequenciamento - Rifampicina .....	71
4.5. Cálculos de Sensibilidade e Especificidade .....	73

4.5.1. RT-PCR: no formato simples ( <i>Single</i> ) .....	74
4.5.1.1. Para INH .....	74
4.5.1.2. Para RIF .....	76
4.5.2. RT-PCR: em formato duplo ( <i>Duplex</i> ).....	77
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>88</b>
6.1 Considerações finais.....	88
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>90</b>

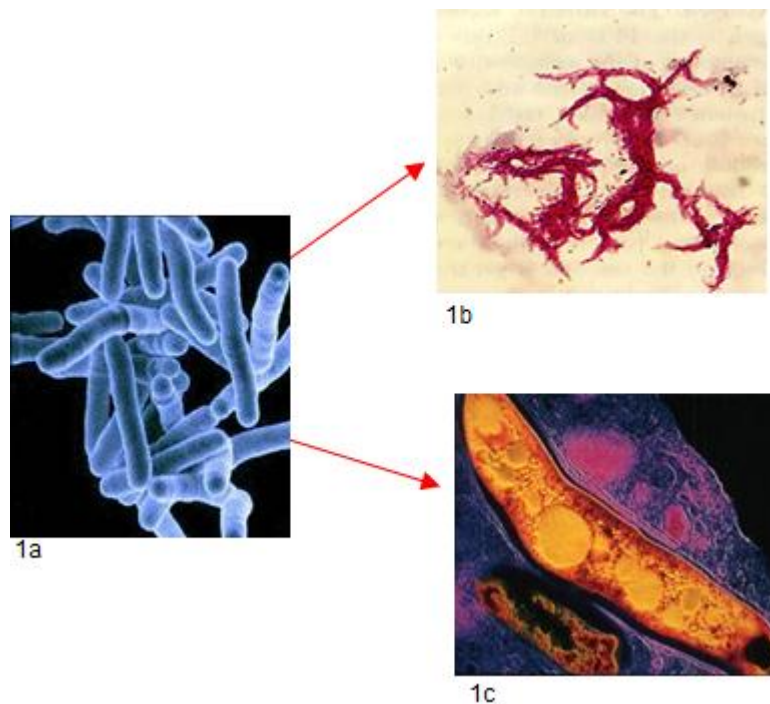
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Classificação, morfologia e doença

A espécie *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) é classificada taxonomicamente no grupo de espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* do gênero *Mycobacterium* da família *Mycobacteriaceae*, subordem *Corynebacteriaceae*, ordem dos *Actinomycetales*, classe *Actinobacteria*, subreino *Bactéria* do reino *Monera* e domínio *Prokaryota* (Garrity et al., 2007).

A classificação do gênero *Mycobacterium* é definida por três critérios principais: resistência à descoloração por álcool-ácido pela técnica de Ziehl-Neelsen, concentração entre 58 e 71% das bases C-G no DNA e síntese de ácidos micólicos (Levy-Frebault e Portaels, 1992; Cole et al., 2001).

As micobactérias são bactérias aeróbicas de crescimento lento, pois demoram entre 16 a 20 horas para se multiplicarem, apresentam a forma de bastões, sendo assim denominados de bacilos, que podem ser retos ou ligeiramente curvos medindo entre 0,2 e 0,6  $\mu\text{m}$  de largura por 1 a 10  $\mu\text{m}$  de comprimento. São imóveis, com ausências de esporos e cápsulas. Suas colônias não contêm pigmentação (acromógenas) e formam ramos alongados e tortuosos caracterizando a formação em corda, o qual é utilizado como um dos indicadores do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Brasil/MS, 2002; Cole et al., 1998).



### Figura 1- Aspectos da morfologia do MTB

**Legenda:** Morfologia do MTB pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (1.a e 1c). Cultivo típico de MT com formação do fator corda em lâmina corada pela técnica de Ziehl Neelsen (1b).

**Fonte:** <http://www.raw-milk-facts.com/images/tuberculosis.html>;

<http://traumwerk.stanford.edu/mycobacteriumtuberculosis>.

Várias espécies de micobactérias podem causar a tuberculose (TB) em humanos e animais e estão agrupadas no Complexo *Mycobacterium tuberculosis* as espécies: MTB, *M. microti*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* e *M. canettii*. Este complexo se diferencia das outras micobactérias pela presença de marcadores moleculares em seu DNA, ausências de pigmentação das colônias e de inibição do crescimento na presença de ácido-p-nitrobenzóico (PNB), (Cole et al., 1998; Palomino et al., 2007).

As micobactérias quando submetidas à coloração com fucsina fenicada quente pelo método de Ziehl-Neelsen ou a frio pela auramina, resistem à descoloração por álcool acrescido de ácido, configurando a sua classificação como bacilo-álcool-ácido-resistente (BAAR), devido à presença de ácido micólico na composição de sua parede celular. Apresentam

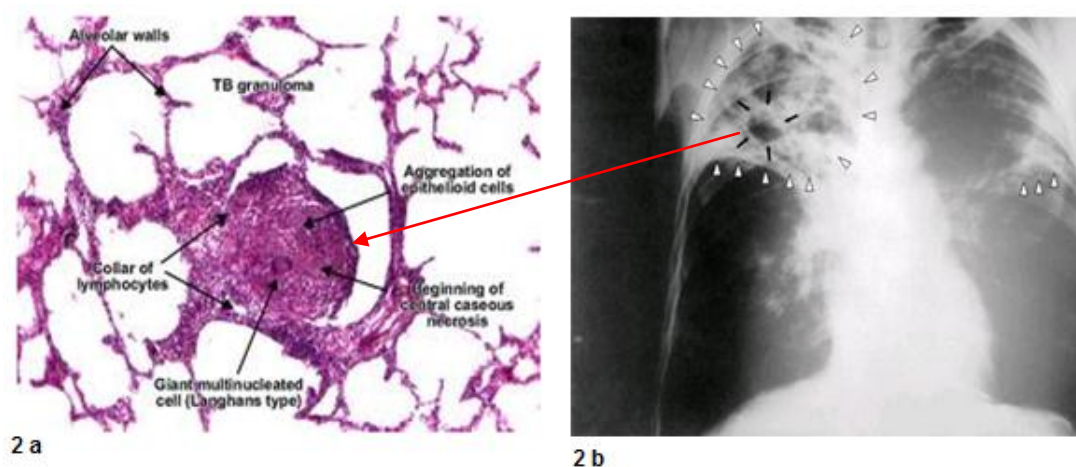
também alto teor lipídico em sua parede celular, responsável pela formação de granuloma no sítio da infecção (Brasil/MS, 2002; Leão, 2004).

O genoma do MT possui 4.411.529 pares de base (pb), presenças repetidas de vários genes e elementos de inserção, principalmente o IS6110, alta concentração das bases nitrogenadas Guanina e Citosina. Grande parte do genoma codifica enzimas que agem na degradação de lipídeos do hospedeiro do MTB, que serão convertidos em nutrientes e precursores para constituição de sua parede bacteriana. (Brasil/MS, 2002; Palomino et al., 2007).

A doença é adquirida pelo contato direto com aerossóis expelidos de indivíduos bacilíferos, principalmente durante a tosse, que os liberam no ar sob a forma de gotículas infectantes. As gotículas mais leves ficam em suspensão por várias horas, e as que contem os núcleos secos (núcleo de Wells) com 1 a 2 bacilos em seu interior e diâmetro de até 5 µm conseguem penetrar pela mucosa respiratória, e se não eliminados pelo sistema de defesa, atingem os alvéolos pulmonares onde se multiplicam. Macrófagos pulmonares são ativados para promover a fagocitose dos bacilos e conter a infecção, porém algumas dessas células de defesa não conseguem efetivar sua ação, devido a mecanismos de escape desenvolvidos pelo bacilo, permanecendo com o bacilo íntegro em seu interior, assim o bacilo consegue se multiplicar no interior desses macrófagos. Neste momento, outros fatores do sistema imune são desencadeados no intuito de conter a dispersão dessas células infectadas, dando início à formação de um granuloma tuberculoso, no qual o bacilo pode se manter em estado de latência por muitos anos, podendo ou não ser reativado. Uma vez reativados os bacilos podem ser disseminados a vários outros tecidos/órgãos ocasionando, de acordo com o local acometido, outras manifestações de TB. A evolução para a infecção está diretamente associada a vários fatores sociais, genéticos e/ou imunológicos do indivíduo exposto, além da carga e virulência do bacilo (Brasil/MS, 2002).



Visualizamos na **Figura 2**, a imagem de um raio-X de tórax e esquema de um granuloma de TB.



**Figura 2- Esquema do granuloma tuberculoso**

**Legenda:** Calcificação caseosa/granuloma tuberculoso pela coloração de hematoxilina-eosina (2a); raio-X de tórax (anteroposterior-AP) revelando a formação de cavitação típica de TB pulmonar na região apical direita e infiltrado pulmonar bilateral (2b).

**Fonte:**

[http://www.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.pathologyatlas.ro/pathology\\_atlas\\_imagini/pulmonary\\_tuberculosis\\_chro](http://www.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.pathologyatlas.ro/pathology_atlas_imagini/pulmonary_tuberculosis_chro)

<http://www.saberweb.com.br/wp-content/uploads/imagens/doencas/tuberculose/01g.jpg>,

<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>

As aglomerações nos sistemas prisionais está entre os maiores fatores de risco de adoecimento e disseminadores da tuberculose, determinados pelo EPI-Tb 2005, elevando esses fatores em 20 vezes em relação à população geral. Já entre as doenças associadas destaca-se o alcoolismo (12%) superando a Aids (11%), o diabetes (5%), doença mental (2%) entre outras causas indefinidas (BEPa 2006). Estima-se também que 1 indivíduo bacilífero irá propagar a sua TB a 10 ou 15 pessoas no decorrer de 1 ano (Dye et al., 2005; Kritski et al., 2005).

## **1.2. Breve histórico**

### **1.2.1. Do descobrimento a epidemiologia atual**

A TB é uma das doenças infecciosas mais antigas, há relatos de lesões tuberculosas observadas em esqueletos datados de 2000 anos antes de Cristo, que afetam a humanidade e que perdura até os dias atuais, apesar de tratável, com um alto índice mundial de indivíduos acometidos (Brasil/MS, 2009).

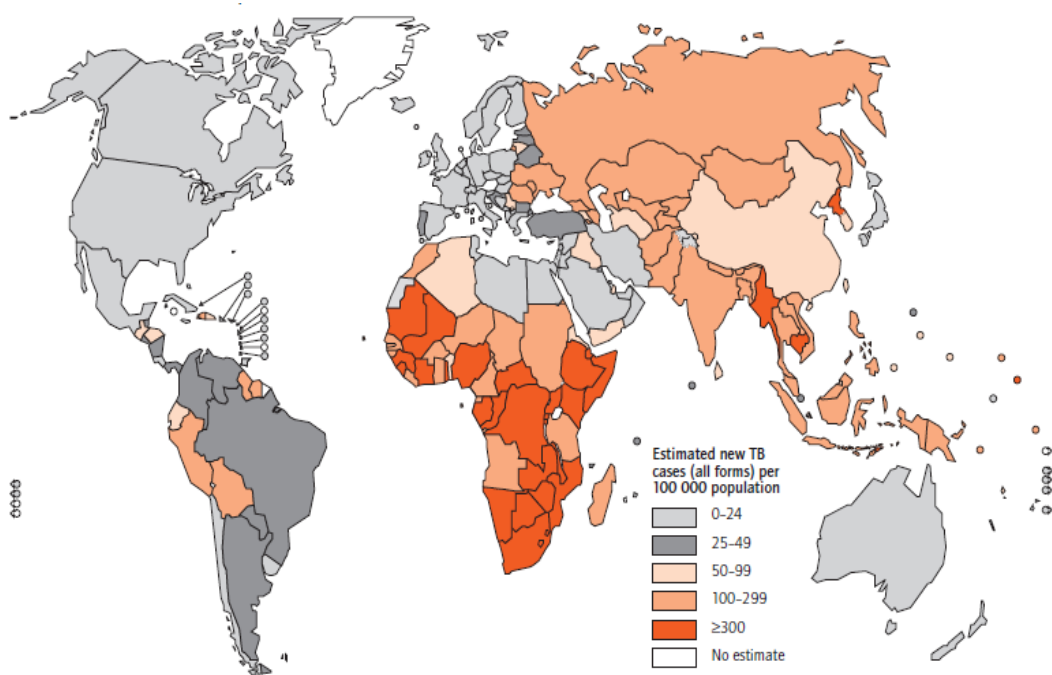
O nome TB foi proposto em 1839 pelo médico Johann Schönheim, e o acometimento pulmonar e comprovação da doença em 1865 por Jean Villemin. Em 1882 o MTB, agente etiológico da tuberculose, foi isolado e cultivado pelo médico alemão Robert Koch, sendo desde então referenciado como bacilo de Koch e premiando-o com o Nobel de Medicina (Daniel et al., 1994).

A industrialização iniciada no século XVIII levou ao desenvolvimento desestruturado de cidades densamente povoadas, extenuação da mão-de-obra disponível, que acrescidas às condições inadequadas de higiene e nutrição, acarretou na disseminação da tuberculose, transformando-a em epidemia, e com isso favorecendo sua propagação pela Europa, Américas e África (Ribeiro, 1955).

As conquistas territoriais e colonizações históricas promoveram à propagação mundial do bacilo da tuberculose, no Brasil a TB chegou por volta de 1.500 com os jesuítas e escravos africanos que aqui desembarcaram na época do descobrimento e rapidamente se espalharam as tribos indígenas reduzindo drasticamente o seu contingente. O desenvolvimento urbano e populacional que se seguiu nos séculos posteriores favoreceu a sua disseminação e estabelecimento no país (Rosemberg, 1999).

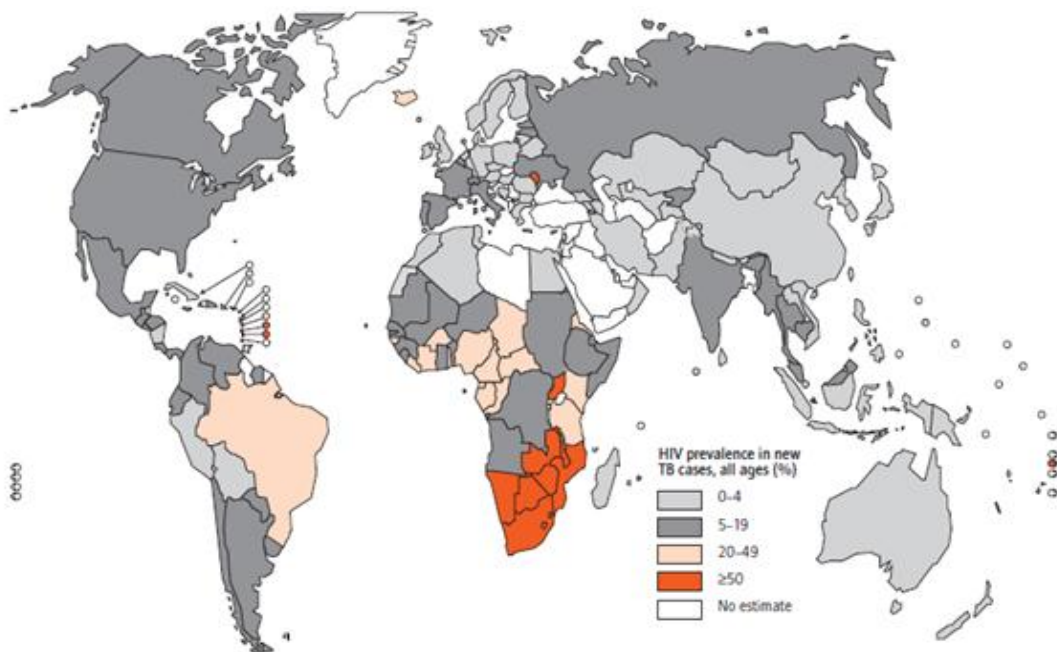
Junto ao desenvolvimento sócio-econômico seguiu-se às melhorias nas ciências médicas, a preocupação com o bem-estar-social com melhorias no sistema habitacional, nutrição e saneamento básico, que entre outros fatores contribuíram para o declínio da TB ao longo do século XX. No entanto, isto não foi suficiente para elevar a TB à tão desejada erradicação mundial, ao contrário, em 1993 a Organização Mundial da Saúde (OMS) declara a sua re-emergência, com um aumento alarmante no número de casos. Entre as principais explicações atribuídas a esse evento destacam-se a pandemia da Aids resultando na coinfeção TB X Aids, pois se estima que entre 8 a 10% dos casos de TB mundial estão vinculadas à AIDS e a evolução das tuberculoses multi-drogas resistentes (MDR-TB), Gandy e Zumla (2002).

Atualmente as infecções pelo MTB continuam sendo a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo, em 2008 em torno de dois milhões de mortes (4.500 mortes/dia) e nove milhões de novos casos de TB foram reportados globalmente e 5% destes classificados como resistentes às drogas anti-TB (WHO, 2009). Dados da OMS revelam que o Brasil está entre os 22 países responsáveis por 80% dos casos de TB no mundo com uma incidência de 48/100.00 habitantes (WHO, 2009), sendo no Estado de São Paulo o maior contingente, 20% de todos os casos (Seicento et al., 2009). No país a TB é a 4<sup>a</sup> causa de mortalidade entre as doenças infecciosas e a 7<sup>a</sup> no ranking de gastos com internações e a 2<sup>a</sup> ou 1<sup>a</sup> em letalidade para pacientes HIV positivos, cuja co-infecção compreende 14% do total de casos brasileiros (Brasil/MS/SVS, 2005). Abaixo visualizamos os mapas compilados pela OMS, referentes à incidência mundial da TB (**Figura 3**) e TB/HIV (**Figura 4**).



**Figura 3- Estimativa de incidência de TB/mundo em 2008 (WHO2009).**

**Fonte:** Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3



**Figura 4- Estimativa de incidência TB/HIV (casos novos TB) no mundo em 2008 (WHO 2009).**

**Fonte:** Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3

O uso prévio e inadequado de medicamentos também contribui ao desenvolvimento da resistência prejudicando a efetividade do tratamento da TB. A resistência micobacteriana aos quimioterápicos da tuberculose é um fenômeno biológico natural, selecionando-se bacilos mutantes entre uma população selvagem. Para avaliar a eficácia do tratamento é necessário classificar o tipo de resistência apresentada (Brasil/MS, 2010), sendo:

- Resistência primária a que se verifica em pacientes sem histórico de tratamento anterior e contaminados com bacilos previamente resistentes ou cuja periodicidade do tratamento foi inferior a 1 mês.
- Resistência adquirida ou secundária a que se verifica em pacientes com tuberculose inicialmente sensível, mas que desenvolvem a resistência após a exposição aos medicamentos em uso a mais de 1 mês.
- Resistência global ou combinada àquela encontrada nos pacientes avaliados independente do histórico anterior.

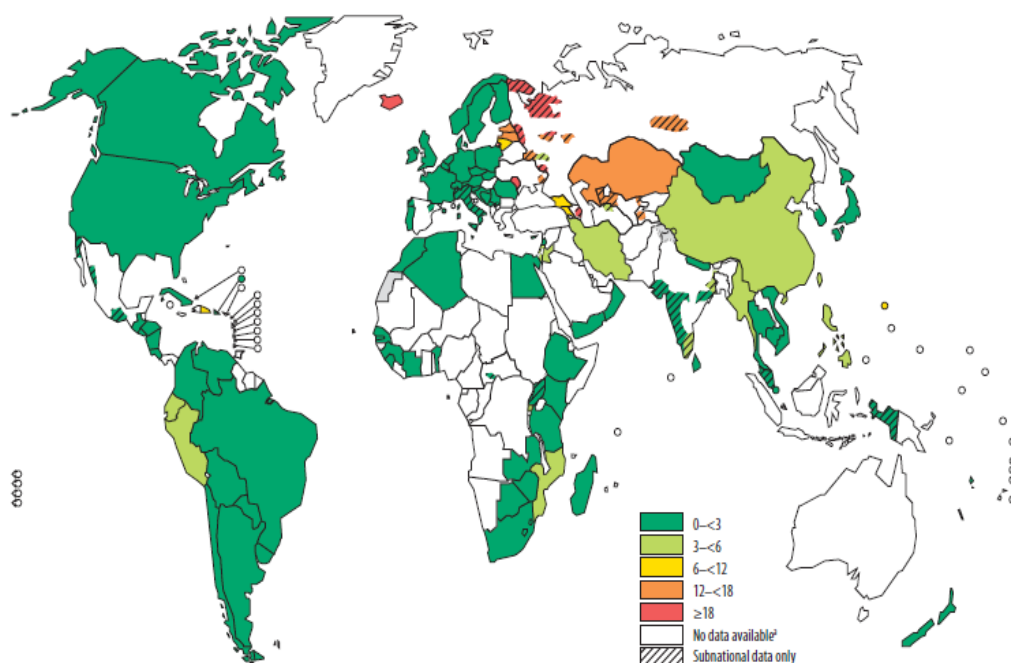
Diferentes padrões de resistência podem ser apontados por testes de susceptibilidade as drogas como monorresistencia (1 droga), polirresistencia [2 drogas ou mais, com exceção da rifampicina (RIF) e isoniazida (INH)], multirresistência-MDR (resistência a RIF e INH) e resistência extensiva-XDR ( RIF, INH, fluorquinolona e injetável de segunda linha), (Brasil-SVS, 2010; Rocha et al., 2008).

Para a Organização Mundial da Saúde (OMS) a MDR-TB pode ser adquirida ou desenvolvida durante o curso do tratamento com a RIF e INH, as mais efetivas drogas de combate a TB (Hofling et al., 2005).

Desde 1994 a OMS recebe periodicamente relatórios de 114 países que promovem a vigilância de MDR-TB verificando a sua crescente mundial (5% entre os casos novos notificados), (WHO, 2009).

Entre os casos de MDR-TB, 150 mil mortes foram globalmente relatadas em 2008, destas 97.000 sem associação com HIV. Na **Figura 5**

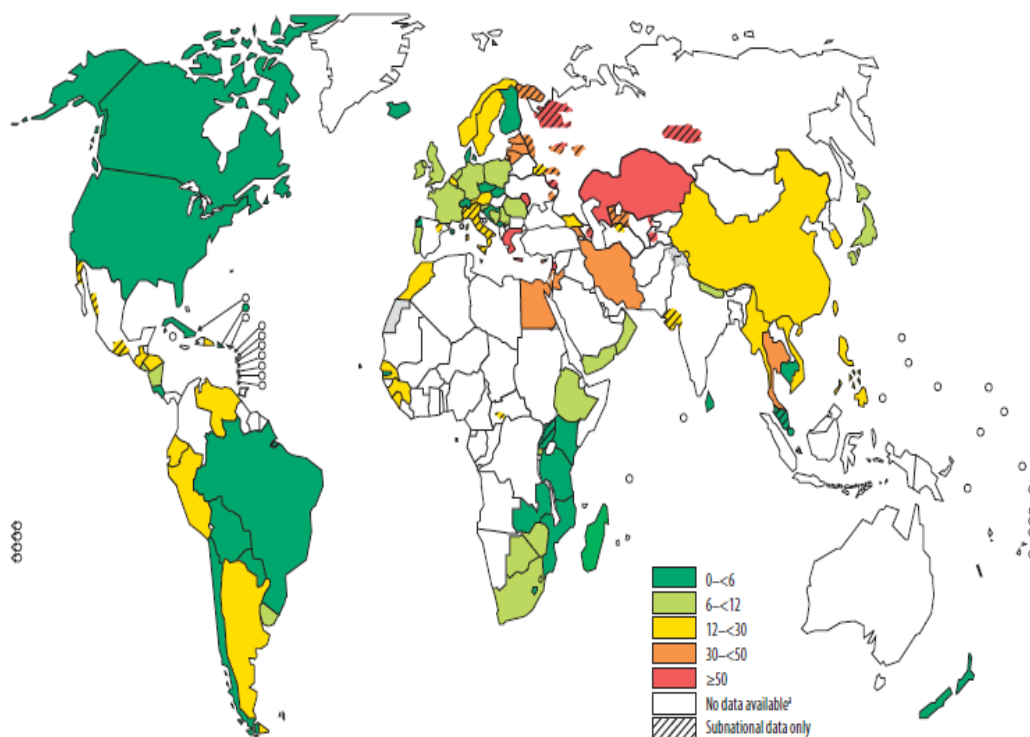
esta demonstrada à compilação dos dados mundiais de MDR-TB entre os novos casos de TB, entre eles verificou-se no Brasil uma estimativa entre 0-3% (WHO, 2010).



**Figura 5- Distribuição mundial de MDR-TB entre casos novos notificados, segundo relatório WHO 2010.**

**Fonte:** Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3

Já entre os casos com antecedentes de tratamento, a frequência de resistência tem se mostrado maior, neste contexto o Brasil dobra o seu intervalo de incidência, bem como outros países, como podemos visualizar no mapa abaixo (**Figura 6**).



**Figura 6- Distribuição mundial de MDR-TB entre casos previamente tratados, notificados segundo relatório WHO 2010**

**Fonte:** Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3

Além da crescente preocupação com os casos TB-MDR, há a evolução mundial dos casos TB-XDR (super ou extensivamente resistentes), para os quais a dificuldade terapêutica é ainda maior.

EM 2008, 963 casos de XDR foram mundialmente relatados podendo este número não corresponder à realidade devido à dificuldade em se diagnosticar esse padrão de resistência, novamente o Brasil está entre os países nos quais foram relatados ao menos 1 caso de XDR até janeiro de 2010 (WHO, 2010), demonstrados na **Figura 7**.



**Figura 7- Notificação mundial de no mínimo 1 caso de XDR-TB até janeiro de 2010.**

**Fonte:** Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3

### **1.2.2. Tratamento quimioterápico**

As primeiras tentativas de desenvolvimento de drogas para o tratamento da TB iniciaram-se em 1914 por Selman A. Waksman, que isolou e purificou a actinomicina, todavia, apesar do efeito inibitório do crescimento do MTB “in vitro” se mostrou extremamente tóxica para o uso em animais e humanos, sendo então descartada. Em 1943 Selman obteve resultados promissores com a Estreptomicina, com eficácia considerável e menor toxicidade, sendo então iniciada como tratamento para TB em 20 de novembro de 1944. Porém com o uso da monoterapia, começaram a surgir casos de resistência, acarretando no declínio do tratamento, felizmente com a associação de outras drogas ao tratamento este retornou a sua eficácia,



surgindo assim o esquema de tratamento com associação de drogas. Nos anos consecutivos, novas drogas foram sintetizadas como o ácido paraminossalicílico em 1946, INH em 1952, pirazinamida em 1954, cicloserina em 1955, etambutol em 1962, RIF em 1967 e a partir dos anos 70 os aminoglicosídeos e quinolonas (Cole e Telenti, 1995; Daniel et al., 1994).

No Brasil o esquema de associação de drogas utilizando estreptomicina, INH e ácido paraminossalicílico por um período de 12 a 24 meses, foi introduzido pelo Professor Hélio Fraga e alterado nos anos 80 com a introdução da RIF e pirazinamida, ao invés da estreptomicina e ácido paraminossalicílico mantendo-se a INH no esquema e redução do tratamento para 6 meses (Brasil/MS, 2002).

Atualmente o controle da TB consiste em programas governamentais, no qual está incluso o DOTS (Estratégia de Tratamento Diretamente Observado), que visam diagnosticar e tratar os casos de TB a fim de interromper o mais rápido possível a transmissão da doença. Para minimizar a emergência e disseminação da resistência às drogas o princípio do tratamento quimioterápico básico é administrar simultaneamente múltiplas drogas para as quais o microrganismo é sensível (Brasil/MS/SVS, 2009; CVE, 2010).

Devido ao aumento da resistência primária a INH de 4,4% para 6% e de 1% para 1,4% quando associada a RIF, apontados pelo II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos, o método padrão recomendado pela OMS para o tratamento da TB no Brasil é um regime de multi-drogas, recentemente reformulado, em uma fase inicial (dois meses) são utilizados 4 fármacos: RIF, INH, pirazinamida e etambutol. Na segunda fase, que em geral é de 4 meses, são utilizadas somente as drogas INH e RIF. Caso haja alguma intolerância e/ou falência à RIF ou INH, estas drogas são substituídas por outras ao qual o bacilo seja suscetível, entre elas as quinolonas, aminoglicosídeos. Os casos de MDR são avaliados

individualmente de acordo com o padrão de resistência e clínica apresentadas, esticando-se o tempo de tratamento geralmente entre 12 e 24 meses (Brasil/MS/SVS, 2009; CVE, 2010).

### **1.3. Mecanismos de resistência**

Nos últimos 10 anos, o mecanismo de ação da maioria dos agentes anti-tuberculose (anti-TB) foi descrito e com isso começamos a entender o mecanismo molecular pelo qual o MTB se torna resistente. O bacilo da TB é frequentemente adquirido muito cedo na vida de um indivíduo. A primo infecção dá início ao desenvolvimento de certa imunidade e formação de granuloma e calcificação. Isto é seguido por um período de latência de tempo variável, o qual continua até ocorrer à reativação em uma proporção destes indivíduos. Isto significa que os bacilos tuberculosos possuem pouca oportunidade de interagir e trocar informação genética com outros, como por exemplo, organismos que colonizam a nasofaringe ou o trato gastrointestinal. Nestes locais, outras bactérias podem transmitir determinantes de resistência a antibióticos através de elementos de transferência genética, por transdução ou transformação (Dale, 1995).

Apesar de um tratamento adequado levar à cura na maioria dos casos, a frequência de isolados resistentes a drogas tem aumentando nas últimas décadas, sendo uma das causas da falha no tratamento e cura (Telenti e cols, 1993). Em MTB, isolados MDR aparecem como resultado de mutações em genes que codificam os alvos para as drogas e/ou enzimas ligadas a estes alvos (Gillespie, 2002).

Telenti et al. (1993) foram os primeiros a determinarem os sítios de mutação que resultaram na resistência do bacilo à RIF. Eles encontraram 15 mutações distintas no gene *rpoB* entre 64 cepas resistentes a RIF isoladas em diversos países. Cada uma destas mutações resultou em substituição de 1 a 8 aminoácidos em uma pequena parte do gene *rpoB* de 69 pb. Mutações

nos diferentes genes que estão associados à resistência às drogas anti-TB estão sumarizados no **Quadro1**.

**Quadro 1. Genes mutados e elemento de inserção (IS) de MTB relacionados à resistência as drogas.**

<b>Droga</b>	<b>Gene ou elemento genético associado</b>	<b>Referência bibliográfica</b>
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Ramaswamy e Musser, 1998
Isoniazida	<i>katG, inhA, oxyR, ahpC, furA</i>	Ramaswamy e Musser, 1998; Telenti 1997
Estreptomicina	<i>rrs, rpsL</i>	Ramaswamy e Musser, 1998
Pirazinamida	<i>pncA</i> , IS 6110	Ramaswamy e Musser, 1998; Morris et al, 1995;
Etambutol	<i>embB</i>	Ramaswamy e Musser, 1998
Fluoroquinolonas	<i>gyrA, gyrB</i>	Takiff et al, 1994; Telenti 1997

Desde sua introdução a RIF tem sido uma componente chave na terapia de infecções tuberculosas. A resistência a ela está relacionada a mutações na subunidade  $\beta$  da RNA polimerase DNA dependente, codificada pelo gene *rpoB*, onde ocorre a ligação da droga inibindo a transcrição de RNA e por consequência a síntese de proteínas (Ramaswamy e Musser, 1998; Blanchard, 1996). O amplo uso da RIF e seus derivados resultaram na emergência da resistência a ela. Estudos genéticos demonstram que aproximadamente 95% das mutações associadas à resistência a RIF,

ocorrem na região de 81 pares de bases do gene *rpoB*, que codifica os aminoácidos de posição 507 a 533, as outras 5% ocorrem fora desta região (Telenti et al., 1993; Cole e Telenti, 1995). Os isolados sensíveis à RIF não possuem mutações neste gene; assim, a presença de mutação indica que o isolado de MTB é resistente à RIF. A RIF é um excelente marcador de isolados MDR, pois todos estes isolados são resistentes à RIF (Telenti e cols, 1993). As frequências comumente encontradas destas mutações são 41% no códon 531, 32 a 36% no códon 526, e 7 a 9% no códon 516 (Ramaswamy e Musser, 1998; Abate et al., 2001; Torres et al., 2003).

Em muitos casos, mutações gênicas associadas com resistência a drogas podem causar diferentes níveis de resistência ou podem não estar diretamente relacionadas ao mecanismo de resistência. Este é o caso da INH. Mutações parciais, totais, pontuais ou inserções no gene *katG* que codifica para a catalase-peroxidase, eliminam ou diminuem a atividade da catalase e produzem altos níveis de resistência à INH (Zhang et al., 1993; Heym et al., 1999; Ramaswamy e Musser, 1998).

A atividade da enzima catalase é essencial para ativar a INH em seu derivado ativo hidrazina, que entre outras funções atua inibindo a síntese de ácido micólico, componente estrutural rígido da parede das micobactérias, permitindo a sua ruptura. A deficiência em atividade enzimática produz altos níveis de resistência encontrada em mais de 80% das isolados resistentes à INH (Piatek e cols, 2000). Alternativamente, baixos níveis de resistência podem ser causadas por mutações pontuais na região do promotor do gene *inhA*, o qual codifica a enzima *inhA* (enoyl-ACP-redutase) que catalisa uma etapa primária na biossíntese do ácido micólico.

Assim, contrariamente a relação direta entre mutações no gene *rpoB* e resistência à RIF, os isolados resistentes à INH mostram mutações em diversos genes, sendo que 75% de todas as mutações já descritas, ocorrem no códon 315 do gene *katG* ou *inhA*, seguidos por mutações nos genes *oxyR*, e *ahpC* (Valim et al., 2000; Rossetti et al., 2002). Entretanto, muitos

isolados clínicos de MTB resistentes a RIF e INH não possuem mutações nestes alvos, mas a presença de mutações nestes sítios é indicativa de resistência (Telenti e cols, 1993; Zhang et al., 1993).

Estudos que compreendem dados brasileiros descrevem porcentagens similares de mutações nos genes *rpoB* e *katG* (Brasil/MS, 2008; Valim et al., 2000), aproximadamente 60% a 62% das mutações no *katG* estão localizadas no códon 315, e 64% das mutações no gene *rpoB* estão localizadas nos códons 526, 531 e 533 (Williams et al., 1994; Espinal et al., 2001).

Os dados, entre 1986 a 1990, referentes ao perfil de resistência a drogas nos isolados de MTB no Brasil, principalmente no Estado de São Paulo são preocupantes. A análise do perfil de resistência, publicado por Silva (1992) neste Estado, revelou uma taxa inicial de 16,54% e adquirida de 47,45%. Este perfil pouco se alterou quase 20 anos após, pois o Núcleo de Tuberculose e Micobacteriose do Instituto Adolfo Lutz (NTM-IAL), laboratório de referência estadual, recebem anualmente cerca de 5.000 isolados, 80% destas são submetidas ao teste fenotípico de sensibilidade para INH e RIF entre outras drogas. Dos 11.900 isolados processados nos últimos 3 anos (2007 a 2009), 15% apresentaram algum tipo de resistência e 5.5% foram MDR (comunicação pessoal: Dra. Rosângela Siqueira de Oliveira-NTM-IAL).

### **1.3.1. Perfil de resistência de MTB isolados no Brasil**

Resultados dos Inquéritos Nacionais de Resistência aos Fármacos anti-TB, demonstram que do primeiro inquérito (1995-1997) para o segundo inquérito (2007-2008), houve uma crescente nos dados de resistência brasileiros, sendo de 4,4% para 6% a resistência primária à INH, de 1,3% para 1,5% a resistência primária à RIF e de 1,1% para a multirresistência primária (Santos e Galesi, 2010).

Segundo Vareldzis et al., 1994, (*apud* WHO/TB/84), no mínimo 15% dos casos de TB nos países em desenvolvimento apresentam algum tipo de resistência. Nos dados obtidos pelo IAL decorrentes da análise de 1.448 isolados processados nos últimos 4 anos (2004 a 2007), provenientes do Estado de São Paulo, verificou-se a presença de algum tipo de resistência, sendo no ano de 2004 de 17%, 2005 15%, 2006 15% e 2007 15%, compondo uma média geral de resistência para esses anos de 16% de resistência contra 84% de sensibilidade.

### **1.3.2. Importância do conhecimento das mutações e suas frequências**

Ramaswamy e Musser (1998) compilaram dados de estudos epidemiológicos diversos onde 96% das mutações no gene *rpoB* comprometiam a região de 81 pares de base, sendo 43% destas no códon 531 e 36% no códon 526, com a substituição de Serina por Leucina (42%) no 531 e Histidina por Treonina (23%) no 526 as mais frequentes, além disso as mutações nos códons 513, 526 ou 531 foram associadas a um alto nível de resistência e nos códons 514 ou 533 a um baixo nível de resistência à RIF. Já pra INH a posição 315-Serina com substituição por Treonina foi a mais comum, alterando substancialmente a atividade da catalase, porém mutações no códon 463-Leucina, não alteraram esta atividade. Ao nível de redução ou inibição total da atividade da enzima vincula-se o nível de resistência à droga.

No entanto, sabe-se que a variação geográfica influencia a frequência e o tipo de mutações, como resultado da disseminação regional de isolados resistentes. Como exemplo, podemos citar que:

- I- A frequência em isolados Americanos do códon 526 mutado para TAC no gene *rpoB* é de 30% e de apenas 12% em isolados de 9 outros países (Telenti et al., 1993).
- II- Nenhum dos isolados resistentes à INH na Guiné Equatorial tinham

mutações no principal gene envolvido na resistência a isoniazida, o *katG*, mas sim mutações no gene *inhA* em 80,5% (Tudó et al., 2004).

- III- A influência da área geográfica nos tipos de genes envolvidos na resistência e frequências de certas mutações nestes genes têm implicações importantes no desenvolvimento de estratégias moleculares destinadas à identificação rápida destes mutantes (Haas et al., 1997).

#### **1.4. Diagnósticos de sensibilidade e resistência às drogas**

Atualmente o diagnóstico rápido para avaliar a sensibilidade ou resistência às drogas utiliza a metodologia da cultura líquida contendo antibióticos, teste este denominado de TSA (Teste de Susceptibilidade às Drogas), pelo sistema BACTEC-MGIT960 (Tubo indicador de Crescimento de Micobactéria). Com este sistema foi possível reduzir o tempo diagnóstico para 7 a 14 dias, em comparação ao método anterior, o da proporção em meio Loweinstein-Jensen (LJ), ainda amplamente utilizado, cujo período mínimo estima-se entre 20 a 25 dias (Carvalho et al., 2007). Essas metodologias requerem o crescimento/cultivo do MTB, que permanece como padrão-ouro para o diagnóstico definitivo, mas leva semanas até a obtenção de resultados. Neste sistema, o crescimento bacteriano é precocemente acusado pelo consumo de oxigênio e liberação de fluorescência. O TSA utiliza como princípio o método das proporções em LJ, amplamente utilizado para detecção de resistência (El Hajj et al., 2001; Wada et al., 2004).

O desenvolvimento de metodologias que permitam um rápido diagnóstico de TB resistente é muito importante para o controle e redução na disseminação da doença, sendo uma urgência na Saúde Pública. Dentre essas tecnologias destacam-se as moleculares empregando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR).

A PCR consiste na amplificação “*in vitro*” de sequências específicas de DNA sintetizadas enzimaticamente. Muitos pesquisadores têm pesquisado e desenvolvido métodos “*in house*” com diferentes protocolos e modelos desta reação, no intuito de aplicá-la para o diagnóstico da resistência às drogas anti-tuberculose, muitas indústrias também apresentam diferentes sistemas de detecção, alguns em fase de avaliação e outros já disponíveis no mercado (Pai et. al, 2009), entre esses sistemas estão:

- Análise de Polimorfismo Conformacional - SSCP PCR (*Single-Strand Conformation Polymorphism*), no qual o DNA é amplificado e seu produto é submetido a eletroforese, observando-se a diferença no padrão de migração do fragmento de DNA (Orita et al., 1989; Telenti et al., 1997).
- PCR *Heteroduplex* cujo princípio é a diferença de migração apresentada devido às diferenças na conformação da molécula de DNA, onde 2 fragmentos de DNA (idênticos ou não) são desnaturados e posteriormente hibridizados, caso haja diferença entre os fragmentos (alteração de bases) resultará em 3 fitas duplas, dois pares de fitas totalmente idênticas e um terceiro par com diferenças entre as bases o que promoverá a formação de alças no local da ligação entre essas bases (*heteroduplex*), assim quando submetidas à eletroforese resultarão em 3 bandas, uma delas (*heteroduplex*) com mutação (Williams et al., 1994; Delwart et al., 1993).
- Cromatografia líquida de Alta Eficiência em Temperatura Desnaturante (DHPLC - *Denaturing high performance liquid chromatography*): cujo princípio também é a formação de um *heteroduplex* na qual se detecta a presença de mutação, porém revela-se através da cromatografia ao invés de gel (eletroforese), (Shi et al., em 2006).
- INNO-LIPA Rif TB: kit comercial composto por 10 sondas (fitas



impregnadas com nucleotídeos), cujo princípio é a amplificação (PCR) de um segmento do gene *rpoB* (codifica uma região alvo da resistência à RIF) que posteriormente é desnaturado e hibridizado nessas fitas para ser ou não reconhecida a presença de mutação. Utiliza-se como controle uma sonda específica para o Complexo MTB, nove para perfil mutante e cinco para o perfil selvagem. Este ensaio apresenta a vantagem do tempo de realização (48 horas), porém com a desvantagem do custo elevado (De Beenhouwer et al., 1995; Rossau et al., 1997).

- GenoType MTBDR: Princípio similar ao INNO-LIPA detecta simultaneamente mutações que conferem resistência à RIF e INH, englobando os principais sítios de mutação dos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* (Hillemann et al., 2007).
- LSSP PCR: PCR de baixa estringência (*Low Stringency Single Specific Primer Polymerase Chain Reaction*), cujo princípio é submeter o amplicom do fragmento desejado novamente a PCR em condições de baixa estringência, esse novo amplicom resulta em um perfil de bandas típicas do alvo em questão (Pena et al., 1994).
- GeneXpert: sistema que combina preparação da amostra com extração de ácido nucléico, PCR em tempo real e detecção de resistência à RIF, aplicados diretamente em amostras de escarros, (Helb et al., 2010; Lawn et al., 2011).

Infelizmente há obstáculos que devem ser levados em conta na aplicação desses novos testes, pois além do alto custo, sua disponibilidade ao sistema público de saúde cuja demanda de amostragem é extremamente alta, depende de licitações e pregões, onde o menor preço é preponderante, podendo ocorrer a troca do ensaio, dificultando uma padronização metodológica que permita a avaliação de sua eficácia durante seu uso contínuo. Além disso, existem ainda muitas técnicas de PCR disponíveis para serem padronizadas e otimizadas que podem ser aplicadas em

sistemas públicos de saúde, permitindo ao serviço público reduzir sua dependência das indústrias de *kits* diagnósticos.

Um método mais recente, a PCR em tempo real (RT-PCR) tem sido proposta para detectar a resistência microbiana. Neste sistema um marcador fluorescente e um dispositivo ótico ou câmera CCD (*Charge Coupled Device*) são acoplados a um termociclador, o que possibilita a observação direta da amplificação do DNA.

Esta metodologia emprega um sistema de sonda fluorescente acrescida aos iniciadores (*primers*) que reconhecem sequências específicas no DNA alvo e emitem um sinal fluorescente correspondente ao ciclo de amplificação no qual o DNA alvo é replicado.

Para que haja emissão da fluorescência, a molécula fluorescente ou fluoróforo absorve a energia de uma fonte luminosa, processa essa energia internamente excitando suas moléculas e libera esta energia em forma de luz, num determinado comprimento de onda, o qual é captado pela câmera CCD. Estes sinais após serem analisados por um *software* são plotados em forma de curvas de amplificação e de fluorescência e convertidos em números de *cycle threshold* (Ct) ou *crossing point* (Cp), ou seja, o número exato do ciclo no qual foi sinalizada a amplificação do DNA alvo, capaz de ultrapassar a linha limítrofe entre sinais positivos e negativos, já subtraídos todos os sinais inespecíficos ou de fundo (referência normalizadora), que possam ter sido gerados.

Em resumo, a PCR em tempo real une os processos de amplificação e detecção que são relatados pelo número de Ct ou Cp no qual o produto da PCR acumula-se significativamente em relação aos níveis de referência, detectado pela interação com sondas fluorescentes (Marras et al., 2002).

Tanto os iniciadores (*primers*) quanto a sonda (*probe*) são desenhados para reconhecer uma sequência complementar (ligação entre as bases nitrogenadas A-T, C-G) no DNA alvo, aumentando assim a

especificidade da reação. Esta metodologia é realizada em sistema fechado inibindo possíveis contaminações ambientais e pessoais com material genético e excessivas manipulações dos isolados.

Há vários sistemas químicos empregados na metodologia de RT-PCR disponíveis no mercado, todos com o mesmo princípio químico, sensibilidade e aplicabilidade, alterando apenas os tipos e conformação das sondas.

A maioria das sondas são compostas por uma molécula fluorescente (denominada de *Reporter*) na extremidade 5' e uma molécula bloqueadora (denominada de *Quencher*) na outra extremidade-3'. Enquanto essas duas moléculas de mantiverem próximas não haverá liberação de fluorescência, porém quando forem separadas, cessará a ação do bloqueador e ocorrerá a emissão de fluorescência, isto acrescido a ação corretiva (exonuclease de 5' para 3') da enzima Taq DNA-polimerase, cuja função é estender as novas fitas de DNA que estão sendo replicadas, e corrigir erros de adição de bases. Quando esta enzima encontra algo "estranho" na fita de DNA que está multiplicando, neste caso a sonda ligada, ela promove a sua retirada para dar continuidade a sua atividade, e neste exato momento em que estará sendo amplificado o DNA alvo, ocorrerá à liberação de fluorescência, que será detectada pelo sistema (Marras, 2008).

Existem vários sistemas de PCR em tempo real, os mais comumente encontrados são o formato 5' nuclease, comercialmente conhecido como sistema TaqMan<sup>®</sup>, que utilizam sondas de hidrólise, o *molecular beacons* ou grampos moleculares como modelo de sondas de hibridização, e um corante de DNA dupla-fita, o *Sybr green*, que não se configura como sonda, pois são moléculas ligantes de DNA, que se intercalam neste quando há a formação de dupla fita.

Nos formatos TaqMan<sup>®</sup> e *molecular beacons* há a ação da atividade exonucleásica da enzima Taq DNA polimerase, porém no TaqMan<sup>®</sup> ocorre a cada ciclo, a destruição da sonda e novas sondas são consumidas nos

ciclos seguintes de amplificação, já no *molecular beacons* a sonda se solta do alvo após a hibridização retornando a sua conformação original, estando apta para atuar em cada um dos ciclos posteriores (Espy et al., 2006). Na figura abaixo estão representadas estes 3 modelos de químicas fluorescentes utilizadas no sistema de RT-PCR.



**Figura 8- representação esquemática de três modelos de químicas fluorescentes utilizadas na PCR em Tempo real**

**Legenda:** 8a *Sybr Green*, 8b 5'nuclease (TaqMan<sup>®</sup>) e 8c *molecular beacons*.

**Fonte:** Imagens modificadas e extraídas do site:

[http://e-ciencia.com/recursos/enciclopedia/PCR\\_en\\_tiempo\\_real](http://e-ciencia.com/recursos/enciclopedia/PCR_en_tiempo_real)

Entre as vantagens da RT-PCR está à capacidade da técnica em monitorar a amplificação em tempo real, reduzir o tempo de obtenção dos resultados, simplificar todo o processo envolvido na finalização do ensaio, bem como a minimizar a contaminação ambiental e ampliar o número de amostragem pesquisada (Tyagi et al., 1998; Marras, 2008).

A RT-PCR têm sido proposta para detectar todas as mutações que ocorrem na região de 81 pares de base do gene *rpoB*, no códon 315 do *katG* e sítio de ligação ribossomal *inhA* do MTB por vários autores, pois permite a redução de tempo na obtenção de resultados em relação à cultura (Piatek et al., 1998; El-Hajj et al., 2001; Rossetti et al., 2002; Garcia de Viedma, 2003; Ruiz et al., 2004; Yesilkaya et al., 2006), auxiliando prontamente o clínico sobre o uso do esquema terapêutico apropriado. Com isso, o desenvolvimento de estudos que permitam caracterizar rapidamente a

resistência antimicrobiana na TB e mutações associadas principalmente ao *rpoB* e *katG*, são essenciais no desenvolvimento de estratégias que permitam minimizar a disseminação da doença e cepas resistentes, além de auxiliar no seguimento terapêutico.

A proposta deste trabalho é avaliar a utilização da RT-PCR, empregando-se *molecular beacons*, para a detecção de sensibilidade e ou resistência em isolados, dos principais sítios mutantes para os dois principais fármacos utilizados no tratamento da TB (RIF e INH).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Avaliar a aplicação da metodologia da RT-PCR para a determinação da resistência à INH e RIF do MTB, através da comparação dos dados obtidos por RT-PCR e sequenciamento com os resultados gerados pela determinação da resistência através do método fenotípico (teste de Susceptibilidade às drogas-TSA).

### **2.2. Específicos**

- Padronizar a técnica da RT-PCR para detectar os principais sítios de mutação que conferem a resistência do MTB à INH e RIF.
- Determinar a sensibilidade e especificidade da RT-PCR em comparação ao teste fenotípico (padrão de referência).
- Verificar a frequência e os tipos de mutações encontradas nos isolados provenientes do Estado de São Paulo, avaliadas neste estudo.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Área e população de estudo

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo. Foram selecionados os primeiros 988 isolados de MTB provenientes de pacientes com TB, que vivem no Estado de São Paulo, prospectivamente recebidos pelo Núcleo de Tuberculose e Micobacteriose do Instituto Adolfo Lutz (NTM-IAL) entre 30 de Outubro de 2008 e 13 de Março de 2009 para a realização rotineira do Teste Fenotípico de Sensibilidade às drogas (TSA).

Os isolados foram gerados de diferentes sítios de coleta, realizados em seu local de origem (hospitais) e depois de isolados encaminhados ao NTM-IAL, dos quais foi possível identificar 25 sítios com predominância de coletas do sítio pulmonar, a natureza destes sítios está descrita na **Tabela 4**.

As análises de resistência e sensibilidade foram dirigidas aos fármacos INH e RIF, sendo alvo de estudo para INH os genes *katG* que compreendem os códons 313 a 318 e sítio de ligação ribossomal *inhA* as posições -13 a -18 e para RIF o gene *rpoB* entre os códons 507 a 533.

### 3.2. Definições fenotípicas de resistência

Definem-se fenotipicamente como isolado resistente à RIF e INH, aqueles que através do método “in vitro”, automatizado Bactec MGIT 960, forem capazes de crescer em concentrações de 1,0 µg/mL de RIF e 0,1 µg/mL de INH. O isolado padrão H37RV (ATCC 27294) de MTB foi utilizado como referência para os testes de sensibilidade à INH e RIF, RT-PCR e sequenciamento de DNA dos genes *rpoB*, *katG* e região promotora do gene *inhA*.

### **3.3. Delineamento**

Estudo laboratorial descritivo. Semanalmente foram recebidas cerca de 80 isolados bacterianos para o estudo até a obtenção do total de 988 isolados. Os isolados bacterianos foram submetidos ao teste fenotípico realizado no Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses-NTM (Centro de Bacteriologia), e os testes genotípicos no Laboratório de Diagnóstico Molecular das Infecções Bacterianas-DMIB (Centro de Imunologia). Os isolados foram registrados em ordem crescente de acordo com o lote enviado em planilha no formato Excel do sistema Windows.

A partir dos resultados obtidos pelo teste fenotípico e RT-PCR, selecionamos todos os isolados resistentes a RIF e/ou INH e 10% das sensíveis para amplificação de parte dos genes *katG*, *inhA* e *rpoB* e posterior análise por sequenciamento de DNA destes fragmentos amplificados. Para a seleção dos 10% de isolados sensíveis, foi efetuado um sorteio aleatório com base no total de sensíveis daquele lote, realizando-se uma contagem progressiva de acordo com o número sorteado, para isso foram providenciados papelotes contendo numeração de 1 a 80 dobrados individualmente e colocados em um recipiente para serem agitados e retirados um a um. Caso o número sorteado não estivesse disponível, procedia-se a um novo sorteio. De acordo com o número sorteado, procurava-se no registro daquele lote, após filtragem na planilha, dos isolados sensíveis, qual era o isolado a ser analisada. Todos os isolados foram submetidos a vários ensaios de RT-PCR visando à detecção de mutações ligadas à resistência a INH e RIF.

### **3.4. Preparo das suspensões bacterianas**

Uma alçada dos isolados em meio Lowenstein-Jensen (LJ) foi transferida para um tubo de rosca com tampa contendo 1 mL de água ultra-pura grau PCR e homogeneizadas em agitador de tubos por 5 segundos.



Nos casos dos isolados em meio líquido de 7H9 MGIT 960, foi transferido 1 mL deste crescimento para um tubo de rosca com tampa. Estas suspensões foram aquecidas em banho seco a 100°C por 20 min, homogeneizadas por 5 seg e congeladas a -70°C durante a noite (*overnight*), entre 16 a 18 horas, para promover a morte e ruptura celular. Esta etapa foi realizada no NTM, Laboratório com Nível de Biossegurança 3-NB3, do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

Após este período as suspensões foram encaminhadas ao DMIB-Centro de Imunologia, onde foram novamente aquecidas a 100°C por 20 min, homogeneizadas em agitador de tubos por 5 seg e congeladas a -70°C por 20 min. Findo esta etapa as suspensões foram mantidas dentro da cabine de segurança biológica até serem totalmente descongeladas, posteriormente foram centrifugadas a 10.000g por 2 min, em cabine de segurança biológica, foram transferidos 10 µL de cada sobrenadante para outro tubo contendo 90 µL de água ultrapura grau PCR (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind), obtendo-se com isso uma diluição final a 1/10 de cada suspensão, que foram mantidas à -20°C até serem utilizadas.

### **3.5. Teste fenotípico**

Foi utilizado o método automatizado BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton, Dickson and Company, Maryland, USA) para o teste de susceptibilidade as drogas (TSA) utilizando-se o kit SIRE, contendo as seguintes drogas: estreptomicina (SM), INH, RIF e etambutol (EMB) com as seguintes concentrações das drogas: 1.0 µg/ml de SM, 0.1 µg/ml de INH, 1.0 µg/ml de RIF e 5.0 µg/ml de EMB, de acordo com as instruções do manual de procedimentos da Becton & Dickson (BD), acrescidos de 2 tubos, um contendo meio de crescimento e ausência dos antibióticos SIRE, para controle de crescimento do MTB e outro contendo meio de crescimento e paranitrobenzeno (PNB) que inibe o crescimento do MTB mas não das micobactérias não tuberculosas (MNT), promovendo assim a diferenciação

entre estas. Neste método há a necessidade do crescimento da cepa, a qual é detectada através da fluorescência liberada pelo consumo de oxigênio. Dentre as principais vantagens deste método está a realização de um número maior de exames e o resultado é liberado em menos tempo, cerca de 5 a 11 dias. Outros métodos fenotípicos que utilizam meio de Lowenstein Jensen (LJ), demoram de 20 a 40 dias para serem finalizados e são os utilizados pela maioria dos laboratórios do país.

### 3.6. RT-PCR para identificação de MTB

Para a confirmação da identificação os 988 isolados foram submetidos à reação de RT-PCR utilizando o sistema TaqMan® RT-PCR através da amplificação do gene *mpt64*, específico para o complexo MTB (CMTB), previamente descrita por Takahashi et al., 2006, cujas sequências e concentrações dos iniciadores e sonda estão descritas na **Tabela 1**. As sondas foram marcadas na posição 5' com 6-carboxyfluorescein (FAM) e na posição 3' com Black Hole Quencher 1 (BHQ1).

**Tabela 1. Sequência de iniciadores e sonda utilizados para a reação de TaqMan® RT-PCR para o CMTB.**

Gene alvo	Iniciadores ( <i>primers</i> ) e Sonda ( <i>probe</i> )	Nome	Sequência (5' - 3')	*T <sub>m</sub>	Concentração Final
<i>mpt64</i>	RT-PCR Iniciadores	MyF	GTG AAC TGA GCA AGC AGA CCG	60 °C	300 nM
		MyR	GTT CTG ATA ATT CAC CGG GTC C		300 nM
	RT-PCR Probe	MyPb	FAM-TAT CGA TAG CGC CGA ATG CCG G-BHQ1		100 nM

\*T<sub>m</sub> (temperatura de anelamento), FAM=Fluoróforo; BHQ1=Bloqueador

Um volume total de reação de 25 µL foi utilizado para todas as amostras, composta de 5 µL da suspensão bacteriana pré-diluída a 1/10, 12,5 µL de 2X TaqMan® Master Mix Universal (Universal PCR Master Mix - Applied Biosystems), 2 µL de cada iniciador a 3,75 µM e 2 µL da sonda

a 1,25 µM, 1.5 µL água grau PCR (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind). As ciclagens foram realizadas no aparelho 7.300 ABI Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) da seguinte forma: 1 ciclo de 2 min a 50°C; ativação da enzima por 10 min a 95°C; e 45 ciclos de amplificação de 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C cada. Foram incluídos em cada reação dois poços de controle positivo (cepa H37RV) e quatro de controles sem DNA. Os dados foram coletados na fase de extensão (1 min a 60°C). Ao final da corrida foi estabelecido um valor de “Cycle Threshold” (Ct) ≤ 39 como *cut-off* para determinar a positividade, observando-se a curva exponencial e a compatibilidade dos multicomponentes (cada um dos sinais fluorescentes, incluindo a referência passiva (ROX)).

### 3.7. RT-PCR para detecção de resistência/sensibilidade dos isolados

Para a realização da RT-PCR foi utilizado o sistema *molecular beacons* como composição das sondas. A escolha deste formato baseou-se no trabalho descrito por Piatek et al. (1998) para o gene *rpoB*, incorporando-se este sistema para os demais alvos. Os iniciadores utilizados neste estudo para amplificação dos genes *katG*, *rpoB* e sítio de ligação ribossomal *inhA*, tanto para RT-PCR como para amplificação pré-sequenciamento e sequenciamento, estão descritos na **Tabela 2**, bem como as referências bibliográficas de onde cada um deles foi selecionado. A escolha desses oligonucleotídeos baseou-se no desempenho em termos de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade relatadas, e maiores frequências em que estes foram referenciados em publicações prévias.

Tabela 2. Sequências, Tm, concentrações e referências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e sondas (*probe*), utilizadas para amplificação do gene, sequenciamento e RT-PCR.

Gene alvo	Primers e sondas	Nome	Sequência (5' - 3')	#Tm	Concentração final	Ref
<i>katG</i>	Amplificação	katGf1	GCA GAT GGG GCT GAT CTA CG	60 °C	0.4 µM	Wada, 2004
		katGr1	AAC TCG TCG GCC AAT TCC TC			
	Sequenciamento	katGf2	GGG CTT GGG CTG GAA GAG	50 °C	0.16 µM	van Doorn, 2003
		katGr2	ACA GGA TCT CGA GGA AAC TGT TGT			
	Primers RT-PCR	katGf3	CGT CGG CGG TCA CAC TTT CGG TAA GA	50 °C	600 nM	Piatek, 2000
		katGr3	TTG TCC CAT TTC GTC GGG GTG TTC GT		600 nM	
Sonda RT-PCR	katGpb	FAM*- <u>CCGAGG_CACCAGCGGCATCGA CCTCGG-BHQ1**</u>		300 nM		
Amplificação e sequenciamento		TB92	CCT CGC TGC CCA GAA AGG GA	58 °C	0.4 µM e 0,16 µM	Telenti, 1997
		TB93	ATC CCC CGG TTT CCT CCG GT			
		inhAf	GTG GAC ATA CCG ATT TCG			
Primers RT-PCR		inhAr	CTC CGG TAA CCA GGA CTG AAC GGG	55 °C	300 nM	Piatek, 2000
		inhAPb	FAM*- <u>CGAGG_CCGACAACCTATCGTCTC CCTCG-BHQ1**</u>		300 nM	
Amplificação e sequenciamento		rpoBf1	GGA GGC GAT CAC ACC GCA GAC GTT	60 °C	0.4 µM e 0,16 µM	El Hajji, 2001
		rpoBr1	ACC TCC AGC CCG GCA CGC TCA CGT			
Primers RT-PCR		rpoBf2	GGC CGG TGG TCG CCG CG		300 nM	
		rpoBr2	ACG TGA CAG ACC GCC GGG C		300 nM	
Sondas RT-PCR		SW143	FAM*-CGAGC TCA GCT GGC TGG TGC GCTCG-BHQ1**	50 °C	300 nM	Piatek, 1998
		SW89	FAM* ou HEX*-GCTACG GAG CCA ATT CAT GGA CCA GA <u>CGTAGC-BHQ1**</u>			
		SW111	FAM*-CCACG CCG ACA GCG GGT TGT T <u>CGTGG-BHQ1**</u>			
		SW112	FAM*-CCACG CTT GTG GGT CAA CCC C <u>CGTGG-BHQ1**</u>			
		SW182	FAM* ou HEX*- <u>CCITGG GCC GAC TGT CGG CGC TG CCAGG-BHQ1**</u>			

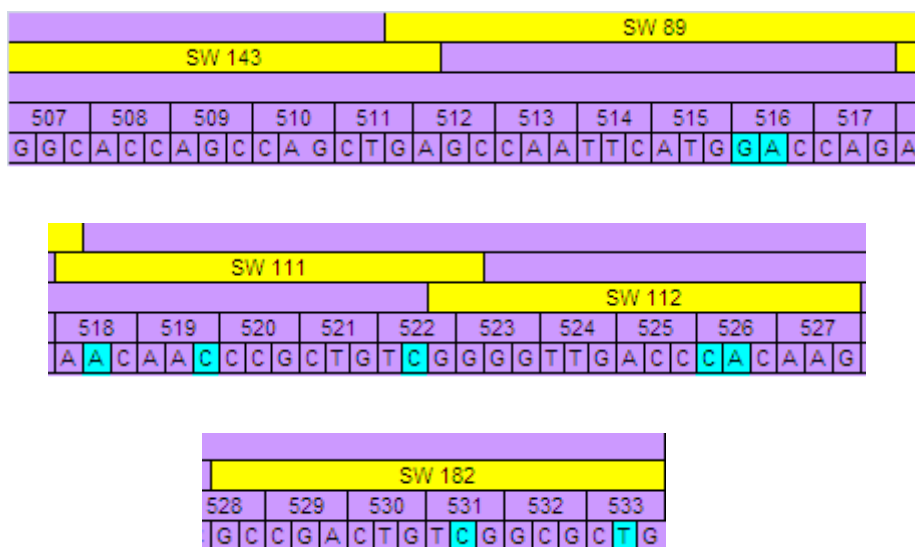
#TM = Temperatura de melting (anelamento/hibridização); Ref= referência bibliográfica; \*Fluoróforo ( Reporter); \*\*Bloqueador (Quencher)

Avaliou-se a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) submetendo suas sequências para pesquisa no Centro Nacional de Informações Biotecnológicas de banco de dados (NCBI), através do algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e com isso foi possível verificar um provável erro na publicação na referência escolhida para o gene *inhA*, pois consta no artigo a sequência para o iniciador antissenso : CTC CGG TAA CCA GGA GTG AAC GGG, e após alinhamento com a sequência do gene, verificou-se que a sequência correta seria CTC CGG TAA CCA GGA CTG AAC GGG, com troca de **G** para **C** (este erro de publicação foi posteriormente confirmado pelo autor do trabalho através de contato por via e-mail).

Todas as sondas utilizadas foram desenhadas para serem capazes de reconhecer a região com sequência complementar referente ao padrão da cepa selvagem H37RV (ATCC 27294), que é sensível tanto a INH como RIF, ou seja, região sem a presença de mutação, ocorrendo a liberação de sinal fluorescente, portanto um isolado sensível, já na presença de mutação não há o reconhecimento pela sonda resultando em ausência de sinal fluorescente, portanto um isolado resistente.

A detecção de resistência a INH foi dirigida ao códon 315 do gene *katG*, sendo a sonda desenhada para reconhecer entre os códons 313 a 318 e para as posições -15 e -16 da sítio de ligação ribossomal *inhA*.

Para a detecção de resistência a RIF foram empregadas cinco sondas separadamente, capazes de reconhecer entre os códons 507 a 533: denominadas de SW143 (códons 507 a 512), SW89 (códons 511 a 518), SW111 (códons 518 a 523), SW112 (códons 522 a 527) e SW182 (códons 528 a 533), cujas posições estão exemplificadas no esquema abaixo:



**Figura 9- Esquema do gene *rpoB*, região entre os códons 507 a 533: em amarelo regiões da abrangência das sondas e em azul sítios de localização das mutações**

As reações de RT-PCR foram realizadas nos aparelhos LightCycler II 480 (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind.) e modelo 7.300 Applied Biosystems ( Foster City, CA, USA).

### 3.7.1. Análise/expressão dos resultados da RT-PCR

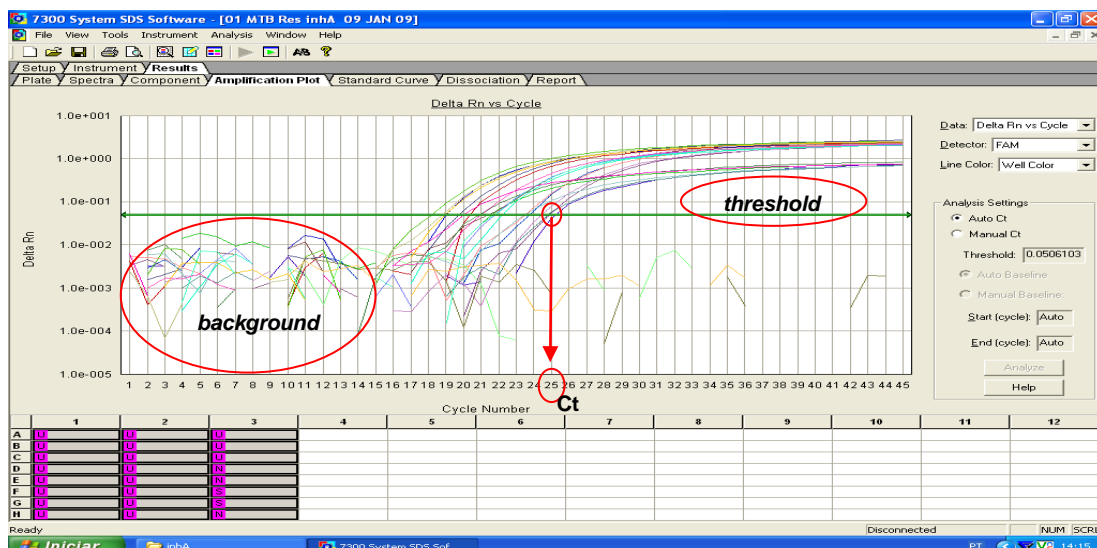
As análises dos resultados foram efetuadas pelos softwares das plataformas utilizadas, a saber: 7.300 Systems Software Sequence Detection Software (SDS) versão 1.2.3 (Applied Biosystems) e LightCycler®480 SW versão 1.5 (Roche Diagnostics), levando em consideração a variação da fluorescência ( $\Delta Rn$ ) em relação ao número do ciclo de amplificação, sendo estatisticamente registrado o ciclo no qual foi emitida a maior intensidade de fluorescência, excluídos os sinais inespecíficos ou de fundo/ruído. Portanto a  $\Delta Rn$  indica a magnitude do sinal gerado, sendo o ciclo no qual este sinal foi computado, inversamente proporcional a quantidade de DNA presente na

amostra. No sistema da Applied Biosystems (ABI) os resultados são expressos na forma de Ct (*Cycle threshold*) e no da Roche Diagnostics (Roche) em Cp (*Crossing point*), (Literaturas gerais e Manuais: ABI e Roche).

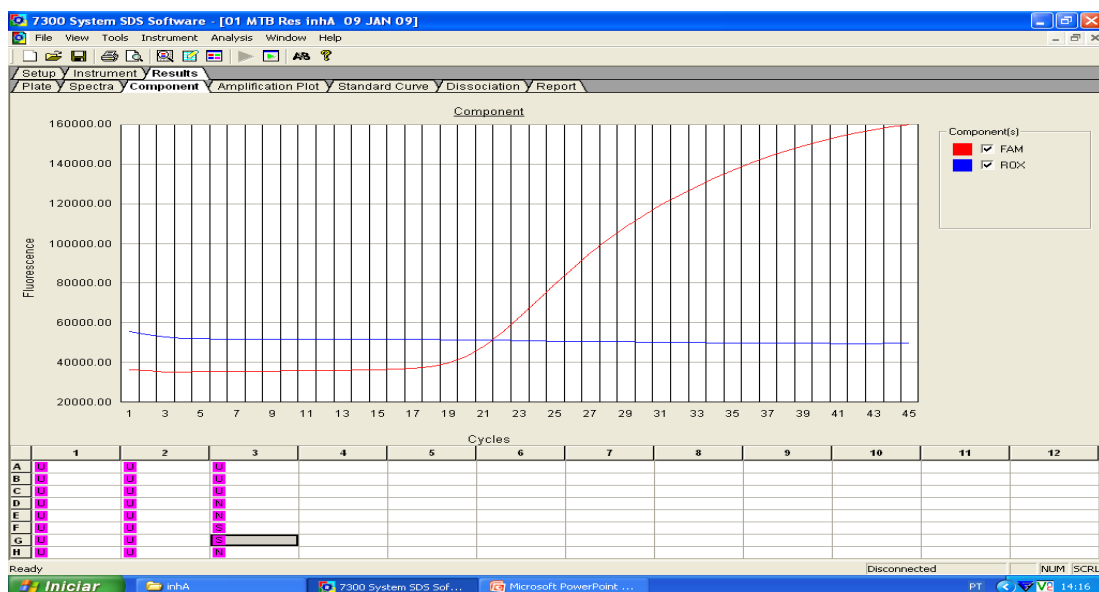
Por conveniência neste trabalho utilizamos para ambas às plataformas a denominação de Ct.

Foram utilizados neste estudo como algoritmos: valores de Ct entre 16 e 39 como indicativos de positividade ou sensibilidade, e valores iguais a 0 e maiores ou iguais a 40 como indicadores de negatividade ou resistência, ficando a faixa entre 1 e 15 para o cálculo da definição da linha limite (*threshold*) e exclusão dos sinais de fundo/ruídos (*background*). Os resultados de Ct=39 foram repetidos e reanalisados, para assegurar a reprodutibilidade e garantir a confiabilidade do resultado.

Nas figuras abaixo podemos visualizar um exemplo das curvas de amplificação (**Figura 10**) e de fluorescência (**Figura 11**), indicativas de positividade na reação (isolados sensíveis).



**Figura 10-** Plotagem das curvas de amplificação da RT-PCR (exemplo), utilizando *molecular beacons*, revelando a presença de isolados sensíveis.



**Figura 11- Plotagem de uma curva de fluorescência (exemplo), liberada durante a amplificação da RT-PCR, utilizando *molecular beacons*, confirmando a presença de isolado sensível.**

**Legenda:** Rox= fluoróforo utilizado como referência passiva (ABI); FAM= fluoróforo utilizado como marcador na sonda para o sítio alvo.

### 3.7.2. Concentração dos oligonucleotídeos: Iniciadores (*Primers*) e Sondas (*Probes*) e Ciclagens

A padronização das concentrações dos iniciadores, senso (F) e antissenso (R), para a RT-PCR do sistema *molecular beacons* foram determinadas testando-se as concentrações entre 300-900 nM e entre 100-300 nM para as sondas, escolhendo-se a menor concentração capaz de produzir o melhor sinal de detecção com menor Ct, após análise detalhada de todas as curvas de amplificação e liberação de fluorescência. Para isso procedeu-se da seguinte maneira: fixou-se a concentração da sonda em 100 nM para todos, variando as concentrações dos oligonucleotídeos (iniciadores) senso (F) nos orifícios horizontais (linha) e do antissenso (R) nos orifícios verticais (coluna), conforme esquema (2) exemplificado abaixo:



**Tabela 3- Esquema das concentrações empregadas na padronização dos oligonucleotídeos (iniciadores e sondas).**

F300	F300	F300
R300	R600	R900
Pb100	Pb100	Pb100
F600	F600	F600
R300	R600	R900
Pb100	Pb100	Pb100
F900	F900	F900
R300	R600	R900
Pb100	Pb100	Pb100

F= Foward (senso); R= Reverse (antissenso); Pb= Probe (sonda)

Findo a determinação da concentração ótima dos iniciadores senso e antissenso, procedeu-se de maneira similar a determinação da concentração da sonda, mantendo-se fixas as concentrações dos iniciadores, agora escolhidos de acordo com a concentração ótima pré-definida para cada gene. As concentrações ótimas escolhidas para trabalho estão descritas na **Tabela 2**.

Para as reações RT-PCR, todas as sondas utilizadas foram marcadas na extremidade 5' com o fluoróforo (*reporter*) FAM e na extremidade 3' com o bloqueador (*quencher*) Black Hole 1 (BHQ1), inicialmente todas as reações focavam em um único alvo (formato "*single*").

À medida que os dados foram sendo gerados, complexamos o ensaio para o gene *rpoB* de 5 reações individuais para o formato "*duplex*". Dois tipos de reações foram então padronizadas, a primeira destinada a detectar apenas um alvo por reação, RT-PCR "*single*" e a segunda, destinada a detectar dois alvos por reação, RT-PCR "*duplex*", acrescentando-se um controle sabidamente resistente e outro sensível para cada uma das sondas, além do controle positivo padrão.

As reações que empregaram dois alvos na mesma reação (formato “*duplex*”) tiveram a sonda para um alvo marcada com o fluoróforo FAM (6-carboxyfluorescein) e a outra, para o outro alvo, marcada com HEX (4,7,2',4',7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein), para que pudessem compor o “*duplex*”.

A escolha das sondas para “*duplex*” baseou-se nas análises de prevalência dos sítios mutantes do gene *rpoB*, duas reações em formato “*duplex*” foram padronizadas. Estes dois ensaios foram capazes de cobrir toda a área onde as mutações encontradas no gene *rpoB* ocorreram. Para controle destes ensaios foram escolhidos isolados sensíveis e resistentes para cada sonda da composição de cada “*duplex*”.

Para aos ensaios de padronização foram escolhidos 2 isolados que apresentassem mutações no sítio alvo de uma sonda, resultando em perfil resistente (mutante) para esta sonda e sensível para a outra e 2 sem a presença de mutação neste mesmo sítio, resultando em perfil sensível para esta sonda e resistente para a outra.

Após vários testes avaliando diferentes concentrações dos componentes da PCR, iniciadores e sondas para a reação de RT-PCR “*duplex*”, escolhemos as combinações que nos forneceram melhor sinal de leitura (curva de amplificação e fluorescência), menor sinal de fundo/ruído (*background*) e melhor definição entre positivos e negativos.

Para as ciclagens na RT-PCR (*single e/ou duplex*) utilizou-se um ciclo inicial de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 30 seg (desnaturação), 50°C por 1 min (anelamento) e 60°C por 1 min (extensão), exceto para a sonda SW 89 do gene *rpoB* e sonda do gene *inhA* cujas temperaturas de anelamento foram a 55°C. Todos os dados foram coletados pelo *software* na fase de anelamento (hibridização) da sonda.

### 3.8. Amplificação e sequenciamento

Para as reações de amplificação e sequenciamento dos fragmentos de 555 pb do gene *katG*, de 248 pb do gene *inhA* e 189 pb do gene *rpoB*, cujas sequências dos oligonucleotídeos estão descritos na **Tabela 2**, foram preparadas misturas para PCR convencional com volume total de 50 µL, dos quais 10 µL foram utilizadas para eletroforese e 40 µL para a reação de sequenciamento.

O ciclo para amplificação dos genes consistiu em uma desnaturação a 94°C por 5 min, a amplificação do produto foi realizada com uma sequência de 30 ciclos, cada um deles composto de 94°C por 40 seg para desnaturação do DNA, 60°C por 30 seg para o anelamento dos iniciadores, 72°C por 20 seg para a extensão das novas cadeias. Ao final dos ciclos seguiu-se um aquecimento a 72°C por 10 min para extensão final e temperatura de manutenção de 4°C até a retirada do produto, com exceção para o gene *inhA* cujo anelamento foi realizado a 58°C por 30 seg.

Para confirmação da amplificação, todos os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1X [Tris-Borato-EDTA; 0,90 mM Tris-HCL, ácido bórico 0,90 mM, EDTA 5 mM (pH 8,0)], acrescido de 0,5 µg/mL de brometo de etídeo (Sambrook et al., 2001).

A eletroforese foi realizada a 100 volts por aproximadamente 1 h e 45 min, em cuba horizontal, sendo aplicados 10 µL do produto de cada PCR acrescidas de 5 µL de tampão de carregamento (Blue Juice: 0,3% de azul de bromofenol, 65% sacarose, 10 mM Tris-HCL pH 7,5, 10 mM EDTA) por caneleta do gel. O marcador 50 bp DNA Ladder (BioLabs®) foi utilizado como padrão de massa molecular. Ao final da eletroforese os géis foram visualizados e documentados no programa Alphamager EC (Alpha Innotech®), pelo sistema de captura de imagem (Alphamager Software).

### 3.9. Purificações dos produtos de PCR

As purificações dos produtos da PCR (40  $\mu$ L) foram realizadas com o Kit comercial PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) seguindo-se as orientações do manual de procedimento do fabricante. Todos os DNA purificados foram dosados pelo equipamento NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) antes de serem sequenciados, para avaliar as quantidades necessárias referidas pelo Kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-Protocol, que compreendem: para produtos entre 100-200 pb (1-3 ng), entre 200-500 pb (3-10ng) e para 500-1000 pb (5-20ng), (Applied Biosystems, 2002).

### 3.10. Sequenciamentos do DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas para cada uma das fitas de DNA de forma bidirecional, utilizando-se Big Dye Terminator versão 3.1 Cycle Sequencing Kit com a enzima AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) no aparelho ABI Prism 3130xl DNA Sequence (Applied Biosystems).

As reações de amplificação pré-sequenciamento foram realizadas em placas de 96 orifícios, em um volume total de 20  $\mu$ L para todas as amostras, compostas de 3  $\mu$ L de produto de PCR purificado, 4  $\mu$ L de tampão 5X, 1  $\mu$ L de iniciador a 0.16  $\mu$ M, 2  $\mu$ L de Big Dye versão 3.1 e 10  $\mu$ L de água grau PCR (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind). Foram preparadas duas reações separadas (bidirecional) uma para o iniciador senso e outra para o iniciador antissenso, as sequências dos iniciadores estão descritos na **Tabela 2**. As amplificações foram realizadas em 25 ciclos de 96°C por 10 seg, 50°C por 5 seg, 60°C por 4 min e mantidas a 4°C até a retirada do aparelho Termociclador Veriti (Applied Biosystems).

Findo esta etapa os produtos foram purificados com etanol de acordo com Protocolo Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing, (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com algumas modificações: centrifugação da placa a 1.500g por 5 segundos, abertura e adição de 80 µL de etanol a 70% (mantido a temperatura ambiente) por orifício, selagem e incubação da placa, mantendo-a em repouso, no escuro em temperatura ambiente, por 15 min. Na sequência a placa foi centrifugada a 1.500g por 45 min a 4°C, aberta e invertida bruscamente sobre a pia para remoção mecânica do volume de seus orifícios. Sequencialmente a placa foi pressionada sobre papel absorvente Kimwipes (Kimberly-Clark Global Sales, Inc., Roswell, GA) para secagem das bordas, em seguida adicionou-se 100 µL de etanol a 70%, selou e centrifugou-se a placa a 1.500g por 45 min a 4°C. Findo esta etapa removeu-se os volumes dos orifícios da placa invertendo-a bruscamente sobre a pia. Na etapa seguinte a placa foi invertida sobre vários papéis absorventes Kimwipes, acondicionada no suporte de placas da centrífuga e fixada com fita crepe para centrifugação a 150g por 10 seg. Ao final a placa foi acondicionada aberta em termociclador a 60°C por 10 min, para secagem, selada e mantida a -20°C até ser efetuado o sequenciamento.

Para o sequenciamento, a placa foi retirada do freezer, estabilizada à temperatura ambiente e 10 uL de formamida HiDi (Applied Biosystems) foram adicionados em cada poço. A placa foi então centrifugada a 1.500g por 5 seg, aquecida a 95°C por 5 min no termociclador Veriti (Applied Biosystems) e colocada em banho de gelo por 3 min antes de ser submetida ao sequenciador ABI Prism 3130xl DNA Sequence (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram editadas, alinhadas e analisadas pelos programas EDITSEQ, ALIGN e SEQMAN (DNASTAR) e comparadas com as sequências depositadas no Genbank de números L27989 (*rpoB*) e X68081 (*katG*).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Sítios de coleta das amostras submetidas ao isolamento.

Do total de 988 isolados submetidos à cultura, em seus respectivos postos de atendimento, foi possível verificar a natureza do inóculo em 85% das amostras (839/988), com a predominância de escarro em 73% (722/988), seguidos de amostras de origem brônquica (aspirado e lavado) em 3% (27/988), sangue em 1% (13/988), dentre o total de 25 sítios identificados.

Em 15% (149/988) dos isolados enviados não foi possível identificar o tipo de amostra submetida ao isolamento, a natureza desses sítios esta descrita na **Tabela 4**.

**Tabela 4. Relação dos sítios das amostras submetidas ao isolamento para pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* e os resultados obtidos.**

SÍTIO DE COLETA DA AMOSTRA PARA CULTURA	TOTAL POR SÍTIO	MGIT 960		RT-PCR	
		RESISTENTE	SENSÍVEL	RESISTENTE	SENSÍVEL
ABCESSO CERVICAL	1		1		1
ABCESSO DA PAREDE ABDOMINAL	1		1		1
ASPIRADO BRONQUICO/LAVADO BRONCOALVEOLAR	27	4	23	2	25
ASPIRADO DE LINFONODO	2		2		2
ASPIRADO DE TUMORAÇÃO	1		1		1
ASPIRADO GANGLIONAR	1		1		1
BIÓPSIA SEM SÍTIO DEFINIDO	2		2		2
BIÓPSIA COLUNA LOMBAR	1		1		1
GANGLIONAR	8		8		8
ESCARRO	722	93	629	68	654
FRAGMENTO PULMONAR	3		3		3
LAVADO GÁSTRICO	4		4		4
LINFONODO	4	1	3	1	3
LÍQUIDO DE ABCESSO	1		1		1
LÍQUIDO ASCÍTICO	6	1	5	1	5
LÍQUIDO PERITONEAL	1		1		1
LÍQUIDO PLEURAL	12	1	11	1	11
LÍQUIDO SINOVIAL	1		1		1
LÍQUOR	9	2	7	2	7
NÓDULO CERVICAL	1		1		1
NÓDULO PULMONAR	1		1		1
SANGUE	13	1	12	1	12
SECREÇÃO GANGLIONAR	4		4		4
SECREÇÃO TRAQUEAL	9	1	8		9
URINA	4		4		4
<b>TOTAL</b>	839				
SEM INFORMAÇÃO	149	25	124	34	115
		129	859	110	878
<b>TOTAL DE AMOSTRAS</b>	988	988		988	

\* Informações coletadas das papeletas de encaminhamento dos isolados ao Instituto Adolfo Lutz Central- Núcleo de Tuberculose e Micobacteriose.

## 4.2. Confirmações do CMTB por RT-PCR

Todos os 988 (100%) isolados selecionados como MTB foram confirmados pelo ensaio de TaqMan® *mpt64* RT-PCR. Todos apresentaram valores de Ct inferiores a 39, sendo o  $Ct \leq 39$  definido como padrão de positivo para este teste. Estas amostras foram posteriormente submetidas à RT-PCR pelo sistema *molecular beacons* para determinação do perfil de sensibilidade e/ou resistência. Estes resultados foram então comparados com o resultado do teste fenotípico (TSA).

## 4.3. Resultados fenotípicos

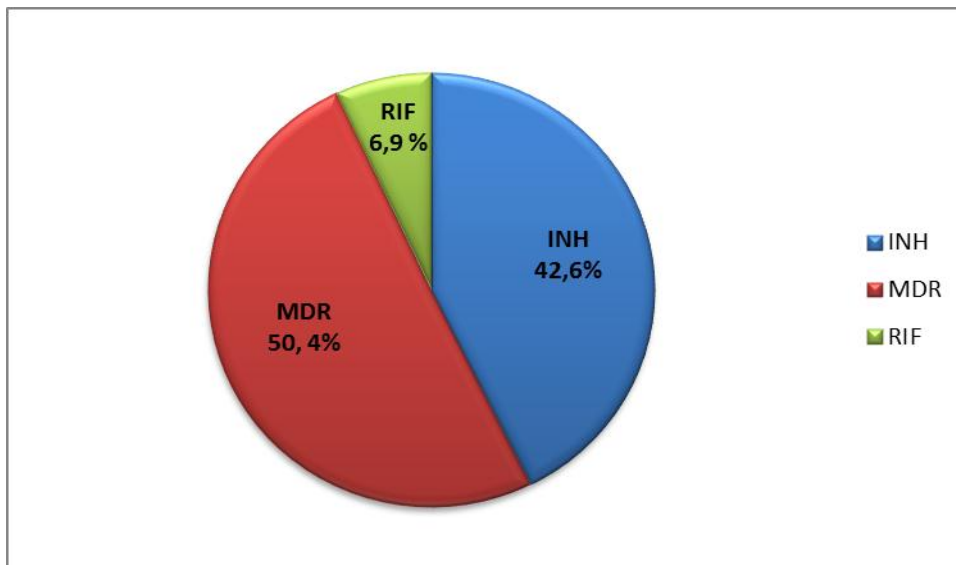
### 4.3.1. Análise dos perfis de sensibilidade e resistência

Dos 988 isolados de MTB analisados fenotipicamente, 87% (859/988) foram sensíveis a ambas as drogas (IC de 95%:85,89). Os 129 (13%) restantes apresentaram resistência à INH e/ou RIF.

Entre os 129 isolados resistentes 55 (42,6%) foram resistentes somente à INH, 9 (6,9%) somente resistentes à RIF e 65 (50,4%) foram resistentes a ambas as drogas (MDR), (**Gráfico 1**).



**Gráfico 1- Distribuição do perfil de isolados de MTB fenotipicamente resistentes.**



INH: Isoliazida; MDR: multi-drogas-resistente; RIF: rifampicina.

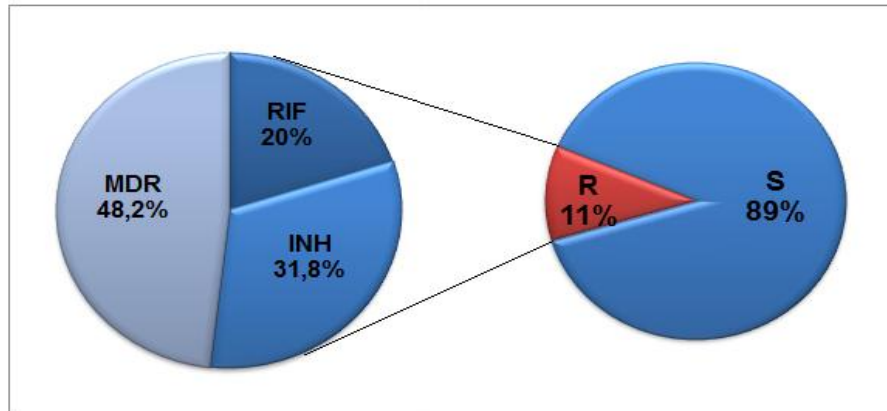
#### **4.4. Determinações genotípicas da resistência**

##### **4.4.1. Por RT-PCR (INH e RIF)**

Dos 988 isolados de MTB analisados por RT-PCR, 89% (878/988) foram sensíveis a ambas as drogas (IC de 95%: 85,89). Os 110 (11%) restantes apresentaram resistência à INH e/ou RIF.

Entre os 110 isolados resistentes 35 (31,8%) foram resistentes somente à INH, 22 (20%) somente resistentes à RIF e 53 (48,2%) foram resistentes a ambas as drogas (MDR), **Gráfico 2**.

**Gráfico 2- Distribuição do perfil dos isolado de MTB para INH e RIF por RT-PCR.**



INH: Isoniazida; MDR: multi-drogas-resistente; RIF: rifampicina; S: Sensível; R: resistente.

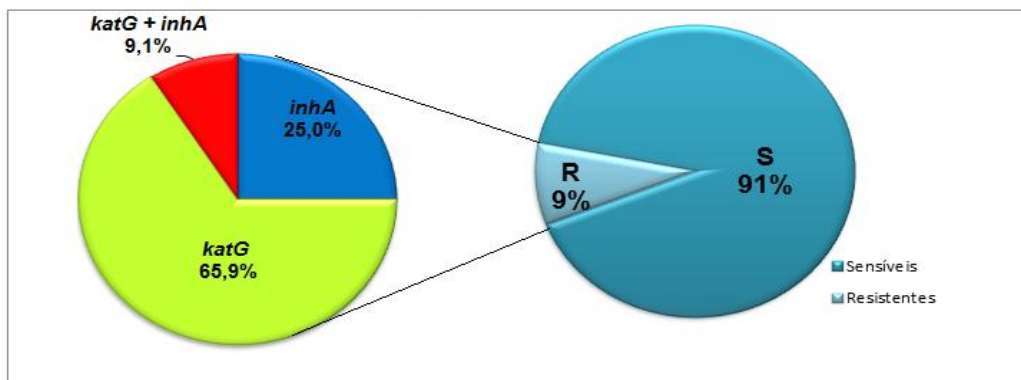
#### 4.4.1.1. RT-PCR - Isoniazida

Dos 988 isolados analisados por RT-PCR 91% (900/988) foram sensíveis à INH e as 88 (9%) restantes resistentes.

Entre os 88 isolados resistentes 58 (65,9%) foram resistentes somente por mutação no *katG*, 22 (25,0%) resistentes somente por mutação no *inhA* e 8 (9,1%) foram resistentes por mutação em ambos os genes,

**Gráfico 3.**

**Gráfico 3- Distribuição do perfil dos isolados de MTB para INH por RT-PCR.**

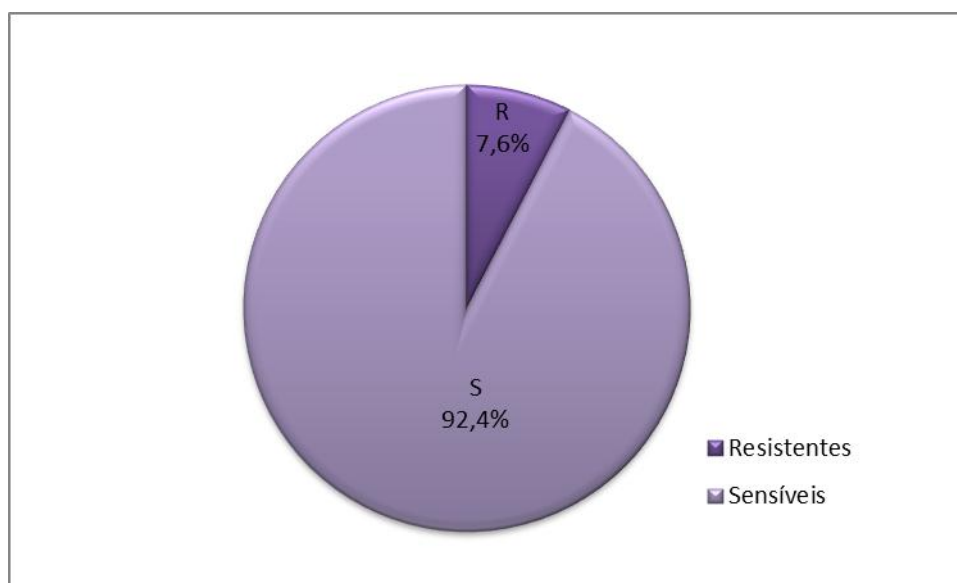


Para os genes *katG* e *inhA*, os valores de Cts apresentados pela RT-PCR ficaram entre  $18 \geq Ct \leq 38$ , sendo a média observada dos Cts de 23, com um desvio padrão de 3.0, estes valores foram arredondados para cima.

#### 4.4.1.2. RT-PCR Rifampicina

Dos 988 isolados analisados por RT-PCR 92,4% (913/988) foram sensíveis e 7,6% (75/988) foram resistentes à RIF, **Gráfico 4**.

**Gráfico 4- Distribuição do perfil dos isolados de MTB para RIF por RT-PCR.**



Para o gene *rpoB*, os valores de Cts apresentados pela RT-PCR ficaram entre  $18 \geq Ct \leq 36$ , sendo a média observada dos Ct de 24, com um desvio padrão de 4.0, estes valores foram arredondados para cima.

Resumimos abaixo (**Tabela 5**) os resultados de sensibilidade e resistência à INH e/ou RIF pelo ensaio fenotípico e RT-PCR no total da amostragem estudada.

**Tabela 5. Resumo da sensibilidade e resistência obtidas nos 988 isolados através dos métodos Fenotípicos e RT-PCR.**

Método	Somente à			Total de RIF	Total de INH	
	INH	RIF	INH+RIF			
Fenotípico	Sensível				(859) 87%	
	Resistente				(129) 13%	
		5,6%	0,9%	6,6%	7,5%	12,1%
		55	9	65	74	120
RT-PCR	Sensível				(878) 89%	
	Resistente				(110) 11%	
		3,5%	2,2%	5,3%	7,6%	8,9%
		35	22	53	75	88

#### 4.4.2. Por sequenciamento

Dos 185 isolados fenotipicamente sensíveis à INH (90) e/ou RIF (95), que foram sequenciados, 2 isolados apresentaram perfil de resistência para RIF (gene *rpoB*).

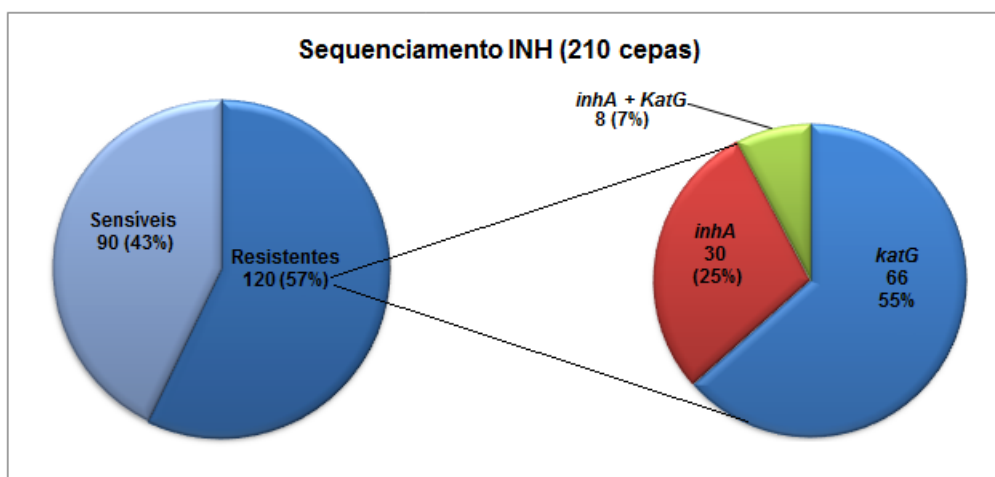
Dos 194 isolados fenotipicamente resistentes à INH (120) e/ou RIF (74), que foram sequenciados, 1 isolado apresentou perfil de sensibilidade para RIF (gene *rpoB*).

##### 4.4.2.1. Sequenciamento - Isoniazida

Dos 210 isolados INH analisados por sequenciamento 120 foram resistentes e 90 foram sensíveis baseados nos resultados fenotípicos. Dos

120 resistentes, 55% (66/120) apresentaram mutações somente no gene *katG*, 25% (30/120) apresentaram mutações somente no gene *inhA* (IC: 95%: 46, 64 e 18, 34), respectivamente, e 7% (8/120) apresentaram mutações nos dois genes, **Gráfico 5**.

**Gráfico 5. Distribuição dos resultados obtidos por sequenciamento para INH.**



#### 4.4.2.1.1. Sequenciamento - Gene *katG*

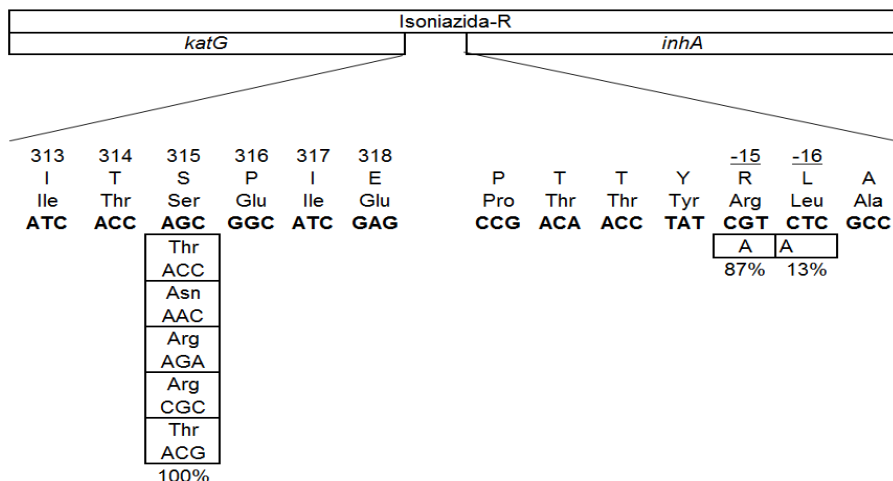
A amplificação e o sequenciamento do gene *katG* só foi possível em 118 dos 120 isolados fenotipicamente resistentes à INH, e destes somente em 65 (55% dos 118 sequenciados), verificou-se a presença de mutação. Foram analisados o sítio que compreende os códons 313 ao 318, e todas as mutações encontradas foram no códon 315. Neste códon, a substituição de AGC para ACC que leva a uma modificação do aminoácido serina para treonina (S to T), foi encontrada em 59 (90%) isolados. Adicionalmente, mutações pontuais neste códon de AGC (S) para AAC (N), AGA (R), CGC (R), ou ACG (T) também foram encontradas, estes dados estão compilados na **Tabela 6** e exemplificados na **Figura 12**.

#### 4.4.2.1.2. Sequenciamento - Gene *inhA*

O gene *inhA* pode ser amplificado e sequenciado em todos os 120 isolados fenotipicamente resistentes à INH. As mutações foram encontradas em somente 30 (25%), (Tabela 6 e Figura 12), abaixo:

**Tabela 6- Mutações gênicas associadas à resistência a INH na TB, em isolados de pacientes do Estado de São Paulo.**

Gene	Isolados com mutação	Codon		Base alterada para	No. De Isolados	% por mudança	% por códon
		Número	Bases				
<i>katG</i>	65	315	AGC	ACC	59	91%	100%
				AAC	2	3%	
				AGA	2	3%	
				CGC	1	1.5%	
				ACG	1	1.5%	
<i>inhA</i>	30	-15	G	A	26	87%	100%
		-16	C	A	4	13%	



**Figura 12- Esquema dos sítios de mutação para INH- resistentes, encontrados nos isolados de pacientes do Estado de São Paulo.**

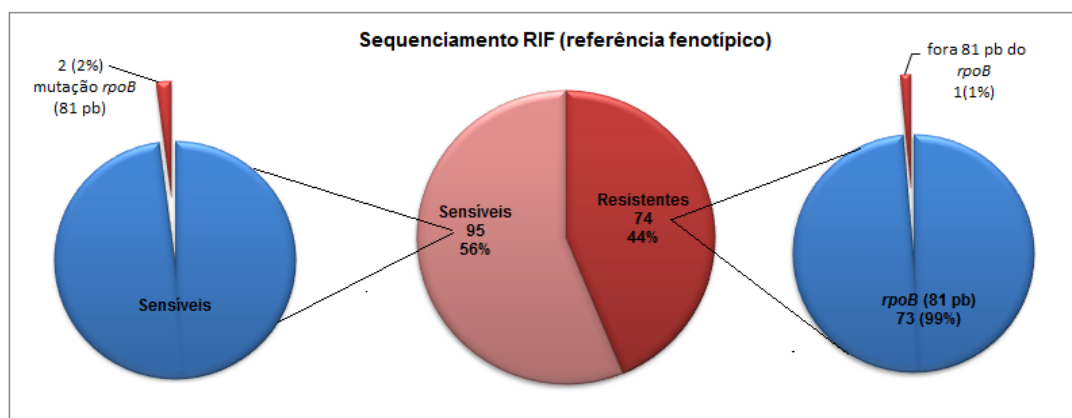
**Legenda:** Localização das regiões dos códons e suas respectivas mutações. Aminoácidos: Isoleucina (Ile), Treonina (Thr), Serina (Ser), Glutamato (Glu), Prolina (Pro), Tirosina (Tyr), Arginina (Arg), Leucina (Leu), Alanina (Ala). Bases nitrogenadas: Adenina (A), Timina (T), Citosina (C), Guanina (G).

#### 4.4.2.2. Sequenciamento – Rifampicina

Dos 169 isolados RIF analisados por sequenciamento, entre as 74 resistentes e 95 sensíveis, baseados nos resultados fenotípicos, obtivemos pelo sequenciamento 75 (44%) resistentes, e 94 sensíveis (56%). Todos os 75 resistentes apresentaram mutações somente na região de 81pb do gene *rpoB*.

Das 74 fenotipicamente resistentes (padrão de referência utilizado), 99% (73/74) apresentaram mutações no gene *rpoB*. Das 95 sensíveis, somente 2% (2/95) apresentaram mutações no gene *rpoB* (**Gráfico 6**).

**Gráfico 6. Distribuição dos resultados obtidos por sequenciamento para RIF.**



Dos 75 isolados sequenciados a mutação mais frequentemente encontrada foi no códon 531 (67%), sendo TCG para TTG (64%; 48/75) e TCG para TGG (3%; 2/75), seguido pelo códon 526 (23%; 17/75), códon 516 (8%; 6/75) com as substituições de GAC para GTC (7%; 5/75) e para TAC (1%; 1/75) e códons 522 (TCG para TTG) e 533 (CTG para CCG) (1%; 1/75 cada). O códon 526 (23%) foi polimórfico com cinco substituições diferentes CAC para: GAC (47%; 8/17), TAC (35 %; 6/17), TGC, CTC, e TGC (18%; 3/17;), (**Tabela 7**).

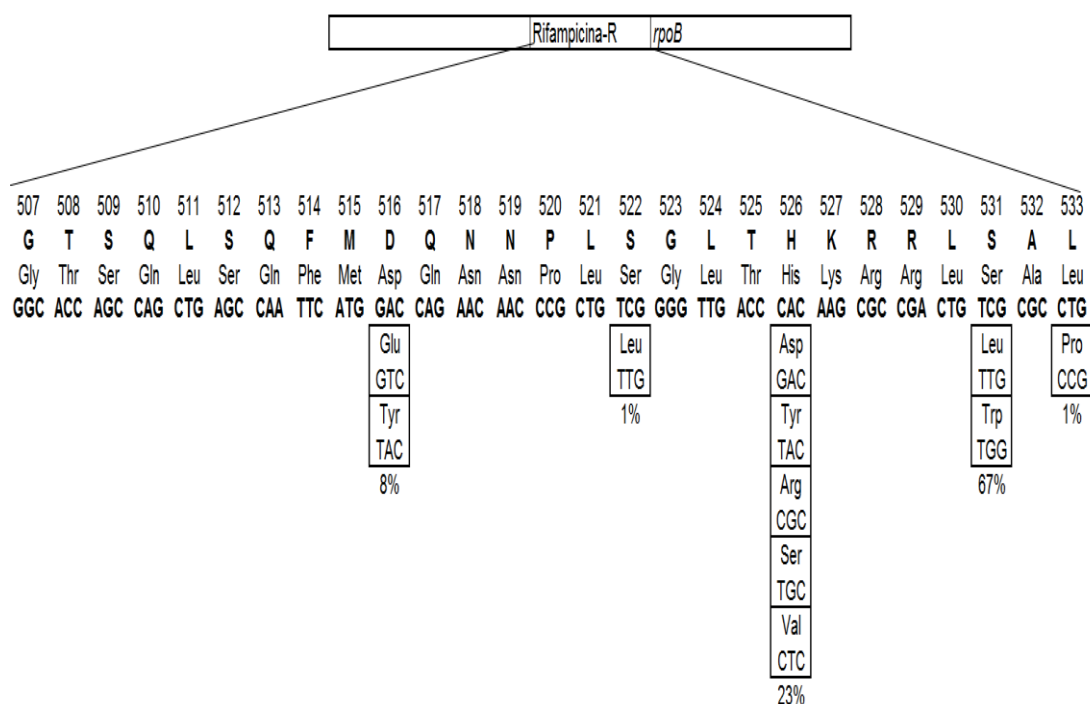
Todas estas mutações foram encontradas pelas análises do sequenciamento de DNA. Elas estão localizadas em quatro das cinco

regiões complementares às sondas utilizadas nas reações de *molecular beacons*. Estas regiões juntas cobrem a totalidade da região de 81 pb do gene *rpoB* (regiões SW89, SW111, SW112, e SW182). Nenhuma mutação foi encontrada na região SW143. Estes dados estão sumarizados na **Tabela 7** e **Figura 13**, inseridos abaixo:

**Tabela 7- Mutações gênicas associadas à resistência a RIF na TB, em isolados de pacientes do Estado de São Paulo.**

Gene	Isolados com mutação	Codon		Base alterada para	No. De Isolados	% por mudança	% por códon
		Número	Bases				
<i>rpoB</i>	75	516	GAC	GTC	5	7%	8%
				TAC	1	1%	
		522	TCG	TTG	1	1%	1%
				526	CAC	CGC	
		TGC	1			1%	
		CTC	1			1%	
		GAC	8			12%	
		TAC	6	8%			
		531	TCG	TTG	48	64%	67%
				TGG	2	3%	
533	CTG	CCG	1	1%	1%		





**Figura 13- Esquema dos sítios de mutação para RIF-resistentes, encontradas nos isolados de pacientes do Estado de São Paulo.**

**Legenda:** Localização da região de 27 códons do gene *rpoB* e seus respectivos aminoácidos. Aminoácidos: Glicina-Gly (G), Treonina-Thr (T), Serina-Ser (S), Glutamina-Gln (Q), Leucina-Leu (L), Fenilalanina-Phe (F), Metionina-Met (M), Ácido aspártico-Asp (D), Asparagina-Asn (N), Prolina-Pro (P), Histidina-His (H), Lisina-Lys (K), Alanina-Ala (A), Arginina-Arg (R), Tirosina-Tyr (T), Triptofano-Trp (W), Valina-Val (V). Bases nitrogenadas: Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) e Guanina (G).

#### 4.5. Cálculos de sensibilidade e especificidade

Para esses cálculos utilizou-se estatística analítica descritiva, pela planilha Excel, do pacote Microsoft Office do Windows 2007, e empregou-se a tabela de contingência 2X2, esquematizada na **Tabela 8**.

Para os cálculos de intervalo de confiança dos dados utilizou-se o método exato descrito por Clopper e Pearson (1934).

**Tabela 8- Esquema da tabela de contingência (2X2) utilizada para compilação dos cálculos estatísticos.**

<b>Para detectar Resistência</b>				
		<b>MGIT 960</b>		
		+	-	
RT-PCR	+	a	b	e
	-	c	d	f
		g	h	N

VERDADEIRO	S
VERDADEIRO	R
FALSO	S
FALSO	R

Sensibilidade em	(d/(h
detectar R	))

S= Sensível; R= Resistente

#### **4.5.1. RT-PCR: No formato simples, ou seja, utilizando um único alvo (SINGLE)**

Todos os 988 isolados foram testados para detecção de mutação de resistência utilizando-se seis ensaios de RT-PCR, um para o gene *katG*, um para o gene *inhA* e quatro para o gene *rpoB*. A sensibilidade e especificidade destes ensaios foram calculadas comparando-se os resultados obtidos nos ensaios de RT-PCR com os obtidos pelo ensaio fenotípico.

##### **4.5.1.1. Para INH**

A sensibilidade da reação de RT-PCR em detectar resistência à INH pela detecção individual de mutações no gene *katG*, utilizando como alvo principal o códon 315 foi de 55% (66/120), IC 95%: 46, 64. **(Tabela 9)**.

**Tabela 9- Sensibilidade e especificidade da RT-PCR em detectar resistência à INH nos isolados de MTB estudados, utilizando a região 315 do *katG*.**

<b>INH por <i>katG</i></b>				
		<b>MGIT 960</b>		
		S	R	
RT-PCR	S	868	54	922
	R	0	66	66
		868	120	988
<b>n = 988</b>				

VERDADEIRO S	868
VERDADEIRO R	120
FALSO S	54
FALSO R	0

Sensibilidade em Detectar R	<b>55%</b>
-----------------------------	------------

R=Resistente; S= Sensível

A sensibilidade da reação de RT-PCR em avaliar a resistência à INH pela detecção individual de mutações no sítio de ligação ribossomal *inhA* foi de 25% (30/120), com IC 95%: 18 ,34, (**Tabela 9**).

**Tabela 10- Sensibilidade e especificidade da RT-PCR em detectar resistência à INH nos isolados de MTB estudadas, utilizando o sítio de ligação ribossomal *inhA***

<b>INH por <i>inhA</i></b>				
		<b>MGIT 960</b>		
		S	R	
RT-PCR	S	90	90	180
	R	0	30	30
		90	120	210
<b>n = 210</b>				

VERDADEIRO S	90
VERDADEIRO R	120
Falso S	90
Falso R	0

Sensibilidade em Detectar R	<b>25%</b>
-----------------------------	------------

R=Resistente; S=Sensível

Quando o resultado de ambas as reações foram combinados, a sensibilidade do ensaio de RT-PCR em detectar resistência à INH através da detecção simultânea de mutações nos genes *katG* e *inhA* foi de 73% (88/120), com IC 95%: 64, 81, (Tabela 11). A especificidade de ambas as reações de RT-PCR foi de 100% (IC 95%: 97,100) quando comparadas às mutações encontradas pelo sequenciamento de DNA dos genes *katG* e *inhA* detectadas pelas sondas utilizadas nas reações de RT-PCR.

**Tabela 11- Sensibilidade e especificidade da RT-PCR em detectar resistência à INH nos isolados de MTB estudados, para os sítios do *katG* e *inhA*.**

<b>INH por <i>katG</i> + <i>inhA</i></b>				
		<b>MGIT 960</b>		
		<b>S</b>	<b>R</b>	
<b>RT-PCR</b>	<b>S</b>	868	32	900
	<b>R</b>	0	88	88
		868	120	988
<b>n = 988</b>				
				VERDADEIRO S 868
				VERDADEIRO R 120
				Falso S 32
				Falso R 0
				Sensibilidade em Detectar R <b>73%</b>

R=Resistente; S=Sensível.

#### 4.5.1.2. Para RIF

A sensibilidade da reação da RT-PCR em avaliar a resistência à RIF pela detecção individual de mutações no gene *rpoB* foi de 99% (73/74), IC 95%: 93, 100. Houve a perda de 1 isolado, que apresentou mutação no códon 522 (TCG para TTG), sonda SW111, e não foi detectada pelo RT-PCR quando foram utilizadas as cinco sondas previamente descritas e referenciando como padrão o teste fenotípico. Porém, se avaliarmos a sensibilidade do teste de RT-PCR em detectar resistência à RIF apenas pelo

sequenciamento teríamos um total de 75 isolados resistentes (**Tabela 12**), onde 2 deles foram erroneamente classificados como sensíveis pelo teste fenotípico, pois apresentaram mutação, um no códon 516 (**GAC para TAC**), e o outro no códon 526 (**CAC to CTC**), detectadas pelas sondas SW89 e SW112, respectivamente.

**Tabela 12- Sensibilidade e especificidade da RT-PCR em detectar resistência à RIF nos isolados de MTB estudados, utilizando a região de 81pb do *rpoB*.**

RIF - <i>rpoB</i> (SW-89 + 111+112+143+182)				
		MGIT 960		
		S	R	
RT-PCR	S	912	1	913
	R	2	73	75
		914	74	988
				VERDADEIRO S 914
				VERDADEIRO R 74
				Falso S 1
				Falso R 2
				Sensibilidade em Detectar R <b>99%</b>
				<b>n = 988</b>

R=Resistente; S= Sensível.

#### 4.5.2. RT-PCR: Em formato duplo, ou seja, utilizando dois alvos (*duplex*)

Todos os 988 isolados foram testados para detecção de mutação de resistência no gene *rpoB*, preferencialmente em dois ensaios de RT-PCR, sendo que em cada um deles foram utilizadas duas sondas diferentes (SW182+SW112 e SW89+SW111).

A sensibilidade e especificidade destes ensaios foram calculadas comparando-se os resultados obtidos no ensaio de RT-PCR com os obtidos pelo ensaio fenotípico. A combinação de duas sondas para cada ensaio RT-

PCR “*duplex*” obedeceu a prevalência das mutações presentes no fragmento de 81 pb do gene *rpoB* encontradas neste estudo.

A sonda SW143 não foi utilizada para a composição do *duplex*, permanecendo no formato individual, pois nenhuma mutação foi encontrada na região complementar a ela, no fragmento de 81 pb do gene *rpoB*.

Houve 100% de concordância entre os resultados do RT-PCR “single” e “duplex”.

## 5. DISCUSSÃO

O aumento da incidência mundial de isolados resistentes às drogas anti-TB remete a imediata necessidade do desenvolvimento de ensaios que possibilitem a rápida detecção de isolados resistentes, pois o conhecimento do padrão de susceptibilidade ao tratamento a ser empregado individualmente é fundamental para a escolha de um regime de tratamento apropriado, aumentando a possibilidade de cura além de limitar a propagação deste tipo de cepa na comunidade.

O Centro de Controle de Doenças americano (CDC) recomenda que informações sobre resistência sejam reportadas no prazo máximo de 28 dias após recebimento da amostra. A análise da susceptibilidade dos isolados de MTB às drogas com os meios de cultura líquida, atual padrão de referência, agilizou a liberação dos resultados, mas o método ainda depende do crescimento bacteriano, que para o MTB é muito lento.

Resultados mais rápidos podem ser obtidos empregando-se técnicas que analisem diretamente o DNA dessas culturas sem a necessidade de se efetuar a subcultura desses isolados (Garcia de Viedma, 2003; Edlin et al., 1992; Fischl et al., 1992).

Ensaio mais rápidos que utilizem análises genéticas para a detecção de mutações associadas com a resistência às drogas já foram descritas (Telenti et al., 1993; Torres et al., 2000; El-Hajj et al., 2001; Torres et al., 2003; Garcia de Viedma et al., 2003; van Doorn et al., 2003; Marín et al., 2004; Kapur et al., 1994; Wada et al., 2004; Yesilkaya et al., 2006), e o ensaio de RT-PCR tem sido proposto como uma alternativa para a detecção de organismos com resistência antimicrobiana (Piatek et al., 2000; Garcia de Viedma et al., 2002; Marín et al., 2004; Ruiz et al., 2004).

A aplicação da RT-PCR com o uso de sondas no formato *molecular beacons* já foi proposta por vários autores, como um método promissor para a detecção de sítios de mutações específicas em genes que conferem resistência às drogas (Tyagi et al., 1998; Cockerill III, 1999; Piatek et al., 2000; Garcia de Viedma et al., 2002; Nyendak et al., 2009).

Os testes de susceptibilidade às drogas devem apresentar sensibilidade e especificidade em níveis capazes de minimizar possíveis resultados falsos, tornando-os tecnicamente confiáveis e clinicamente relevantes (Canetti et al., 1969; Vareldzis et al., 1994).

Do total de amostras analisadas neste estudo 13% delas apresentaram fenotipicamente algum perfil de resistência, esses dados se enquadram a alguns perfis descritos na literatura. Segundo Ramaswamy e Musser (1998), o CDC encontrou 13% de resistência a pelo menos uma droga de primeira linha anti-TB e 1,6% para RIF e INH, entre os casos novos de TB nos Estados Unidos. Nos países que lideram o topo da lista em incidência de TB a situação se agrava, a China reportou ter uma probabilidade (entre 15,9% a 30%) entre os casos novos de possuírem resistência, sendo quase 8% desses MDR em 2000 (Zhang et al., 2007).

Índices diferentes aos encontrados por nós já foram descritos para outros estados brasileiros, Clemente et al. (2008) reporta um percentual de 17% para resistência e 11,9% para MDR para Minas Gerais, no Ceará entre 1990-1999 Barroso et al. (2001) descreve 27% de resistência, no Rio de Janeiro Brito et al. (2004) apresenta em seu trabalho percentual semelhante aos aqui compilados para o Estado de São Paulo. Assim como Marques et al. (2010) no Mato Grosso do Sul entre 2000-2006. A discrepância entre regiões diferentes é esperada, devido às desigualdades sociais encontradas, visto que o aumento da TB está relacionado às condições sócio-econômicas menos favorecidas e aumento da pobreza.

Apesar do avanço obtido com a introdução da quimioterapia no combate à TB e a utilização de dose fixa combinada, além de programas de



tratamento supervisionado, o tratamento da TB ainda permanece como um longo e difícil caminho a ser percorrido pelo enfermo. A desistência durante o percurso torna-se uma realidade, promovendo assim a seleção e disseminação de bacilos resistentes, bem como a criação de reservatórios de resistência na comunidade. As taxas de abandono ao tratamento no Brasil são muito variáveis, ficando em média 14% (Ruffino Netto, 1999), no entanto podem atingir entre 38% a 42%, dependendo da região pesquisada (Rodrigues et al., 2010). Segundo Campos et al. (2000), altas taxas de abandono são documentadas no Estado do Recife, onde 55,8% dos casos em retratamento no ano de 1997 são justificados pelo alto índice de abandono.

Do ponto de vista social, dentre as diferentes formas de tuberculose apresentada pelo enfermo, as de acometimento pulmonar destacam-se como as prioritárias para a Saúde Pública, pois constituem a principal via de disseminação e manutenção da doença, sendo a busca ativa de sintomático respiratório fundamental ao controle da TB (Brasil/MS, 2010). Em nosso estudo pudemos observar que a coleta de sítios pulmonares, com predominância de escarro (73%), destacou-se entre os diferentes tipos de coleta de amostras submetidas ao isolamento. No entanto, devido à disparidade entre as quantidades de diferentes tipos de amostras, não foi possível estabelecer correlação entre sítio e resistência. Entretanto podemos ressaltar que em nosso estudo, dos 129 isolados resistentes à RIF e/ou INH, 72% (93/129) foram isolados provenientes de escarro (**Tabela 4**).

Muitos esforços têm sido feitos pela maior adesão ao tratamento, recentemente foi reformulada a apresentação da quimioprofilaxia com a sua complexidade para o esquema 4X1, ou seja, 4 drogas (Isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol) numa única cápsula, para tentar reduzir a taxa de abandono ao tratamento e com isso bloquear o avanço da resistência bacilar (Brasil/MS/SVS/2010).

O principal mecanismo pelo qual o MTB adquire resistência é pelo acúmulo de pontos de mutação nos genes que codificam os alvos de ação ou de enzimas conversoras das drogas. Quanto as frequências e tipos de mutações encontradas, entre as que envolvem resistência à INH, a substituição de um aminoácido no códon 315 do *katG*, com a alteração de Serina para Treonina (AGC por ACC) é a mais comum em diferentes áreas geográficas (van Soolingen et al., 2000; Clemente et al., 2008; Cardoso et al., 2004; Ramaswamy e Musser, 1998). Esta alteração reduz a atividade da catalase prejudicando a eficiência da INH em seu sítio de ação, outras mutações ou a supressão total do gene são raros (Hofling et al., 2005).

Neste trabalho encontramos esse tipo de alteração (S315T) em 90% das amostras resistentes à INH, seguidas de Aspergina (AGC por AAC), (AGC por AGA), ambas com 3% de frequência e Arginina (AGC por CGC e ACG) em ambas e com 2% de frequência, todas no códon 315 do *katG*. Segundo van Soolingen et al. (2000) isolados com substituição de aminoácidos na posição 315 do *katG*, podem potencializar a resistência, ou seja, são mais propensas de adquirir resistência adicional as outras drogas empregadas no tratamento.

Em relação ao *inhA* a substituição de G por A na posição -15 prevaleceu em 83% (CGT por CAT) dos mutantes. Esta é uma das substituições que ocasiona a expressão exacerbada do gene *inhA*, provocando um aumento no número de sítios alvo para os quais a droga INH é direcionada, resultando em um fenótipo mais resistente à sua ação. Estes dados corroboram com a literatura (Rouse et al., 1995; Morris et al., 1995; Haas et al., 1997; Ramaswamy e Musser, 1998; van Doorn et al., 2003; Wu et al., 2006).

A RIF tem alta efetividade bactericida contra o MTB, sendo, portanto uma componente chave do tratamento e o mais importante agente esterilizante, (Mitchison, 1985). O mecanismo pelo qual o MTB desenvolve resistência a esta droga apontam para alterações na região de 81bp do gene

*rpoB*. Mutações nesta região alteram o sítio de ligação da RIF na subunidade  $\beta$  da RNA polimerase, cuja droga atua inibindo o início da transcrição. As mutações mais comuns neste sítio reportadas são a substituição Ser531Leu (42%) e His526Tyr (23%). Em nosso estudo proporções superiores em alguns sítios de mutação foram encontradas como de 67% no códon 531 com 65% da substituição de Ser531Leu, seguidos do códon 526 (23%), 516 Asp-Glu (8%) e substituições nos códons Ser522Leu e Leu533Pro com 1% cada. O códon 526 foi polimórfico com cinco substituições diferentes, His526/Asp/Tyr/Arg/Ser/Val, nas respectivas proporções 47%, 35% e 6% cada, estes dados se enquadram a outros previamente publicados por Ramaswamy e Musser, 1998; Hofling et al., 2005; Piatek et al., 1998; Rossetti et al., 2002.

Muitos testes diagnósticos foram empregados e avaliados para a triagem de resistência as drogas, a fim de possibilitar a rapidez diagnóstica na tuberculose resistente, porém nem todos ainda aprovados pela FDA (Food and Drug Administration-EUA), apresentando para RIF sensibilidade e especificidade superior a 90%, como o INNO-LIPA Rif (Traore et al., 2000), GeneXpert MTB/Rif (Helb et al., 2010; Lawn e Nicol 2011) e o GenoType MDRTB *plus* (Hillemann et al., 2007 e Bernard et al., 2008), que para RIF possui sensibilidade semelhante aos anteriormente citados e inclui também a INH com sensibilidade avaliada entre 67-88% (Palomino 2009, Brasil/MS 2010).

Neste estudo conseguimos demonstrar que é possível reduzir o tempo de detecção da resistência à INH e RIF para aproximadamente 3 horas pela detecção de mutações pontuais nos genes *katG*, *inhA* e *rpoB* com alta especificidade (100%).

Com uma sensibilidade de 99% para RIF é possível usar este ensaio para a detecção de monorresistência a esta droga, e conseqüentemente a detecção de todos os MDR diagnosticados neste estudo. Dados analisados pelo teste MGIT 960 no primeiro semestre de

2010, demonstraram que 40% dos 216 isolados apresentaram resistência à RIF, com ou sem associação à outra droga, sendo deste montante 5,5% com monorresistência e 34,5% com RIF associado a outras drogas (comunicação pessoal, Dra. Rosângela Siqueira de Oliveira: NTM-IAL), o que possivelmente também seriam detectadas pela RT-PCR, com a vantagem da redução no tempo para este conhecimento (**Anexo 4**). O diagnóstico precoce da resistência a rifampicina é fundamental ao monitoramento e controle da TB-MDR (Williams et al., 1988), principalmente em pacientes HIV positivos, cuja co-infecção com TB-MDR reduz a sobrevivência (Small et al., 1993). Um estudo americano demonstrou que essa coinfeção (TB-MDR X HIV) era 100 % letal e foi reduzida para até 50% por medidas de conscientização e diagnóstico rápido (Salomon et al., 1995).

Já para INH encontramos uma sensibilidade de 55% quando avaliamos somente a posição 315 do *katG* e se acrescentamos da *inhA* (25% individualmente) há um aumento para 73%. No entanto, entre 10-25% de resistência à isoniazida são ainda inexplicáveis, pois não apresentam mutações em genes alvos conhecidos (Riska et al., 2000) e esta problemática parece uma universalidade, Herrera-Léon et al. (2005) desenvolveu um multiplex, para detecção da resistência à INH conseguindo uma sensibilidade de 68,7%, assim como Ruiz et al. (2004), com 53,8% de sensibilidade, ambos com especificidade de 100%.

Neste trabalho os resultados de RT-PCR, confirmados por sequenciamento de DNA foram consistentes com os resultados fenotípicos com duas exceções:

(i), em um isolado a sonda SW111 não foi capaz de detectar a mutação no códon 522 (TCG para TTG) do gene *rpoB*. Não fomos capazes de explicar esta discrepância após inúmeras repetições nos ensaios fenotípicos, RT-PCR e sequenciamento. A mutação em questão, não detectada pela sonda SW111 está localizada muito próximo da extremidade 3' da sequência da sonda, somente 3 nucleotídeos antes do braço da sonda *molecular beacons*.

É possível que a habilidade da sonda SW111 em se ligar ou não, seja afetada quando não houver pareamento na região tão próxima da extremidade 3' da sonda, devido a esta falha, obtivemos uma sensibilidade de 99% na RT-PCR;

(ii), houve também discrepâncias entre os resultados fenotípicos e genotípicos com relação à resistência à RIF em dois isolados. De acordo com as sequências de DNA da região de 81 pb do gene *rpoB* destes dois isolados, eles deveriam ser resistentes fenotipicamente, mas se mostraram repetidamente sensíveis.

Se considerarmos que qualquer mutação na região de 81 pb do gene *rpoB* promove resistência à RIF, estes dois casos demonstram que o ensaio de RT-PCR pode em algumas circunstâncias ser mais acurado do que o método fenotípico. Discrepâncias similares a estas já foram anteriormente descritas, na qual mutações no códon 533, que são compatíveis com a resistência clínica à RIF, não foram detectadas e erroneamente foram consideradas como sensíveis pelo ensaio fenotípico (Riska et al., 2000).

Verificamos neste estudo que, no grupo de amostras analisadas podemos sugerir que houve uma taxa de “erro” do teste genotípico (RT-PCR) para detectar resistência em 1% (1/74) e de 2% (2/95) do teste fenotípico (MGIT) para detectar sensibilidade, quando os comparamos ao sequenciamento.

Todos os 75 (100%) isolados resistentes à RIF, por sequenciamento, neste estudo possuíam mutações no gene *rpoB*. Este dado contrasta outros já publicados mostrando que no Brasil, cerca de apenas 80% a 89% dos isolados resistentes à RIF possuem mutação no gene *rpoB* (Valim et al., 2000; Miranda et al., 2001, Clemente et al., 2008).

Dados anteriormente publicados sobre *katG* mostram que mutações neste gene ocorrem em aproximadamente 60% a 85% dos isolados

resistentes à INH (Rossetti et al., 2002; Cardoso et al., 2004; Hofling et al., 2005; Clemente et al., 2008), mas neste estudo, mutações no gene *katG* estão presentes em apenas 55% (65/118) dos isolados fenotipicamente resistentes à INH. As razões para estas discrepâncias não são totalmente conhecidas, mas é possível que estejam relacionadas à três possibilidades:

(I), diferenças entre os métodos utilizados para a determinação fenotípica da resistência às drogas;

(II), diferenças relacionadas aos locais e ano de isolamento das cepas de MTB;

(III), diferenças no número total de isolados em cada coleção estudada.

O ensaio de RT-PCR não intenciona substituir completamente o teste de susceptibilidade fenotípico, pois estes podem detectar resistência devido a outros mecanismos genéticos ainda não conhecidos e também a um número maior de drogas. Existem várias limitações no uso de ensaios de RT-PCR, por exemplo, a resistência a drogas podem envolver modificações em múltiplos genes e em múltiplas localizações dentro de um mesmo gene. Além disso, os genes e seus mecanismos envolvidos em resistência não foram todos identificados e/ou completamente entendidos, isso representa uma significativa limitação no diagnóstico molecular. Mas o fato de que a grande maioria da resistência à INH e RIF em isolados de MTB é devida a mutações pontuais nos genes *katG*, *inhA* e *rpoB*, respectivamente, técnicas moleculares tais como RT-PCR são promissoras.

Todavia, quando técnicas moleculares são utilizadas, existe a necessidade de monitoramento constante para detectar modificações nos padrões de mutação para que se novos grupos clonais de MTB emergirem, um diagnóstico apropriado seja feito.

O custo de ensaios moleculares “*in house*” pode ser equivalente ou até menor que os custos da técnica fenotípica, especialmente quando meios

líquidos são utilizados. Entretanto, custo, rapidez ou pessoal especializado não são os únicos fatores a serem considerados. Neste estudo as análises das 988 amostras, desconsiderando-se as repetições para ambos os testes, obtivemos para a RT-PCR, um custo total de R\$: 84.888,96 para todos os sítios propostos para a susceptibilidade à INH e RIF (em torno de R\$ 85,92 por amostra), e de R\$: 202.559,76 (custo por amostra estimado em R\$ 205,02) do MGIT 960 utilizando o Kit SIRE, o qual compreende a avaliação de susceptibilidade para 4 drogas. Estas análises estão sumarizadas no **Anexo 3**.

Com a análise molecular de resistência podemos obter informação adicional e essencial, que não são obtidas pelo método fenotípico. Análises genotípicas também mostram quais são as mutações envolvidas na resistência, o que nos ajuda a identificar isolados com alto grau de resistência e/ou a um amplo número de drogas (van Soolingen et al., 2000; Garcia de Viedma et al., 2003). É razoável pensar que para a determinação da resistência em isolados de MTB, o melhor seria ter ambas as metodologias disponíveis no laboratório, e que o uso de cada uma delas se vinculasse a informação clínica do paciente, e mesmo que haja a necessidade de repetições dos testes, considerando que cerca de 1% dos resultados é repetido rotineiramente por motivos técnicos diversos, aumentando o tempo para a liberação dos resultados, isto também poderá ocorrer na RT-PCR, porém com tempo e custos reduzidos.

## 6. CONCLUSÃO

Como os principais sítios de resistência para INH (*katG* 315 e *inhA*) e RIF (região de 81bp do *rpoB*) foram aqui detectados pelo ensaio de RT-PCR com excelente acurácia, este teste poderia ser disponibilizado inicialmente para triagem na rotina de susceptibilidade as drogas, e futuramente com a adição de um alvo ou mais para INH, no intuito de aumentar sua sensibilidade, ser utilizado como diagnóstico para os dois principais fármacos no tratamento da tuberculose.

Embora haja limitação do método RT-PCR em detectar 27% das resistências a INH, este método detectou os isolados monorresistentes à RIF (99%) e todos os MDRs.

### 6.1 Considerações finais:

Este foi o primeiro estudo a utilizar o ensaio de RT-PCR em uma rotina diagnóstica para testar a sensibilidade e resistência em um número grande de isolados no Brasil.

Neste trabalho demonstramos ser viável o uso rotineiro da RT-PCR, favorecendo a dinâmica em laboratórios que apresentem um grande volume de amostragem, aumentando a sua competência diagnóstica tanto em números de ensaios como biossegurança e rapidez.

Por economia de tempo e trabalho, a RT-PCR é uma ferramenta laboratorial importante, pois:

(i), é simples de ser realizada e automatizada para análise de muitas amostras simultaneamente;



(ii), os resultados do ensaio permitem o diagnóstico rápido (menos de 4 horas), e a decisão imediata na prescrição de regimes mais agressivos de terapia permitindo uma antecipação do prognóstico;

(iii), faz o controle de resistência às drogas em casos clínicos com tratamento falho mais rapidamente.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Applied Biosystems. Kit Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit. Protocol. Foster City, CA, USA, 2002; capítulo 2(2-6). [Data de acesso: 19/01/2010]. Disponível em:

[www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/.../cms\\_040026.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/.../cms_040026.pdf)

Barroso AC, Rodrigues JLN, Pinheiro VGF, Campelo CL. Prevalência da tuberculose multirresistente no Estado do Ceará, 1990-1999. J Pneumol. 2001; 27(6): 310-314.

Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. Am J Resp Crit Care. 2008;177: 787–792.

Becton Dickinson BD. Manual BACTEC MGIT 960 SIRE *kits* Para o Teste da Sensibilidade Anti-micobacteriana do *Mycobacterium tuberculosis*. 2007.

Blanchard JS. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Annu Rev Biochem.1996; 65: 215-239.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino/serviço. 5ª Ed. – Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002; pgs:50-56.

Brasil. Ministério da Saúde. SVS-Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Programa Nacional de controle de Tuberculose. Situação da Tuberculose, Avanços e Desafios, 2005. Brasília, 2005.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. 2008.1ª Ed. Brasília-DF, cap 9 pg 325.

Brasil. Ministério da Saúde. Boletim eletrônico Epidemiológico: Informe Eletrônico da Tuberculose. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Julho 2009, ano 9 ,nº 2. [acesso em 09/02/2010]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_tb\\_julho09.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_tb_julho09.pdf).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica sobre mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. Brasília-DF. [Data de acesso: 24/03/2010]. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/tb/mat\\_tec/tb09\\_nt\\_adulto\\_adol.pdf](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/tb/mat_tec/tb09_nt_adulto_adol.pdf).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2010. Programa Nacional de Controle da Tuberculose 2010. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília-DF. [Data de acesso: 20/07/2011]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_de\\_recomendacoes\\_controle\\_tb\\_novo.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_tb_novo.pdf)

Brito RC, Gounder C, Lima DB, Siqueira H, Rodrigues C, Pereira MM, Kritski AL. Resistência aos medicamentos anti-tuberculose de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em hospital geral de referência para tratamento de AIDS no Rio de Janeiro. J Bras de Pneumologia. 2004; 30(4): 425-432.

Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA). Tuberculose no Estado de São Paulo Indicadores de Morbimortalidade e Indicadores de Desempenho, Divisão de Tuberculose e Outras Pneumopatias, São Paulo Setembro/2006, supl(4), vol 3.

Campos HMA, Albuquerque MFM, Campelo ARL, Souza W, Brito AM. O retratamento da tuberculose no município do Recife, 1997: uma abordagem epidemiológica. J Pneumol. 2000; 26(5): 235-240.

Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, et al.. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull World Health Organ. 1969; 41: 21-43.

Cardoso R F, Cooksey R C, Morlok G P, Barco P, Cecon L, Forestiero F, et al.. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 3373-3381.

Carvalho WS, Miranda SS, Pesquero JL, Gomes MA. Diagnóstico de resistência do *Mycobacterium tuberculosis*. Ver. Brás. De Ciências Farmacêuticas. 2007; 43(1): 31-38.

Clemente WT, Lima SSS, Palaci M, Silva MSN, Rodrigues VFS, Costa ERD, et al.. Phenotypic and genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. Diag Microbiol Infec Dis. 2008; 62: 199-204.

Cockerill III FR. Genetic Methods for Assessing Antimicrobial Resistance. Minireview. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1999; 43(2): 199-912.

Cole ST, Telenti A. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Eur Respir J. 1995; 8(20): 701s-713s.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al..  
Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete  
genome sequence. Nature 1998; 393: 537-44.

Cole ST, Supply P, Honore N. Repetitive sequences in *Mycobacterium  
leprae* and their impact on genome plasticity. Lepr Rev 2001; 72: 449-61.

Clopper CJ and ES Pearson ES, The use of confidence or fiducial limits  
illustrated in the case of the binomial. Biometrika.1934; 26:404-413.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica“Prof. Alexandre Vranjac”. Divisão  
de Tuberculose. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de  
Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil. Rev. Saúde Pública 2010; 44 (1):  
197-9.

Dale JW. Mobile genetic elements in *Mycobacteria*. Eur Respir. J.1995;  
Suppl. 20: 633s-648s.

Daniel TM, Bates JH, Downes KA. History of tuberculosis .Capítulo 2, pgs  
13-23. In: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. 1994  
American Society of Microbiology, Washington DC. Editado por Barry R  
Bloom.

De Beenhouwer H, Lhiang Z, Jannes G, Mijs W, Machtelinckx L, Rossau R,  
et al. Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy  
specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay.Tubercle  
Lung Dis. 1995; 76: 425-430.

Delwart EL, Shepaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M., Waigmann  
HR, et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility  
assay: Analysis of HIV-1 env genes. Science. 1993; 262: 1257-1261.

Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Mehran HS, Raviglione MC. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *JAMA*. 2005; 293: 2767-75.

Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH, Crawford JT, Williams J, Sordillo EM, et al.. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*. 1992; 326: 1514-1521.

El-Hajj H H, Marras S A E, Tyagi S, Kramer F R, Alland D. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with molecular beacons. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 4131-4137.

Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, et al.. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1294-1303.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, et al.. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006; 19(1): 165-256.

Fischl MA, Uttamchandani RB, Daikos GL, Poblete RB, Moreno JN, Reyes RR, et al.. An outbreak of tuberculosis caused by multiple-drug-resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection. *Ann Intern Med*. 1992; 117: 177-183.

Gandy M, Zumla A. The resurgence of disease: social and historical perspectives on the “new” tuberculosis. *Social Science & Medicine*. 2002; 55: 385-396.

Garcia de Viedma D, Infantes M S D, Lasala F, Chaves F, Alcalá L, Bouza E. New Real-Time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin

resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2002; 40: 988-995.

Garcia de Viedma D. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 349-359.

Garrity GM, Lilburn TG, Cole JR, Harrison SH, Euzéby J , Tindall BJ. 2007. Part 10 - The *Bacteria*: Phylum "*Actinobacteria*": Class (Actinobacteria. Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7: 399-539. [Data de acesso: 07/01/2011]. Disponível em: <http://taxonomicon.taxonomy.nl/Reference.aspx?id=5436>.

Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46: 267-274.

Haas WH, Schike K, Brand J, Anthor B, Weyer K, Fourie PB, et al.. Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41: 1601-1603.

Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, et al.. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin-resistance using on-demand, near-patient technology. J Clin Microbiology. 2010 January; 48(1): 229-237.

Herrera-Léon L, Molina T, Saíz P, Sáez-Neto JÁ, Jiménez MS. New multiplex PCR for rapid detection of Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(1): 144-147.

Heym B, Saint-Joanis B, Cole ST. The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuber Lung Dis. 1999; 79:267-271.

Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus Assay for Rifampin and Isoniazid Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Clinical Specimens. J Clin Microbiology. Aug, 2007; 45(1): 2635–2640.

Hofling CC, Pavan EM, Giampaglia CMS, Ferrazoli L, Aily DCG, Albuquerque DM, et al.. Int J Tuberc Lung Dis. 2005; 9:87-93

Kapur V, Li LL, Iordanescu S, Hamrick M R, Wanger A, Kreiswirth B N, et al.. Characterization by automatic DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. J Clin Microbiol. 1994; 32: 1095-1098.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas Color. 5a ed., São Paulo: Editora Médica Panamericana;1999.

Kristski, Afrânio. L; Conde, B; Marcus, Souza, R. Muzy. Tuberculose: do ambulatória à enfermaria. 3ªEd. São Paulo: Atheneu; 2005: p.259.

Lawn SD e Nicol MP. Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. Review. Future Microbiol. (2011); 6(9): 1067–1082.

Leão SC, Martin A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo J, Telles MAS, et al. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Brugges: Vanden Broelle; 2004.

Levy-Frebault VV, Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. Int J Syst Bacteriol 1992; 42: 315-23



Literatura Geral/Manuais: Essentials of Real Time PCR (Applied Biosystems) e Roche LightCycler®480. [Data de acesso 21/07/2010]. Disponíveis em: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_042485.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042485.pdf)  
<http://www.roche-applied-science.com/publications/wbt.htm>

Marín M, Viedma D, Ruíz-Serrano M J, Bouza E. Rapid direct detection of multiple rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by Real-Time PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4293-4300.

Marras SA, Kramer FR, Tyagi S. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30 e122.

Marras S A. Interactive Fluorophore and Quencher Pairs for Labeling Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes. *Molecular Biotechnology*, 2008; 38(3): 247-255.

Marques M, Cunha EAT, Ruffino-Netto A, Andrade SMO. Perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* no estado de Mato Grosso do Sul, 2000-2006. *J Bras Pneumol.* 2010; 36(2): 224-231.

Miranda S S, Kritiski A L, Flliol I, Mabilat C, Panteix G, Drouet E . Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Brazil and France. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 247-250

Mitchison D A. Mechanisms of drug action in short-course chemotherapy. *Bull Int Union Tuberc.* 1985; 60: 34-37.

Morris S, Bai GH, Suffys P, Portilho-Gomez L, Fairchok M, Rouse D. Molecular Mechanisms of Multiple Drug Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Inf Dis.* 1995; 171: 954-60.

NyendaK MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. New Diagnostic methods for

tuberculosis. *Current Opinion in Infectious Disease*. 2009; 22: 174-182.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989; 86: 2766-2770.

Pai M, Minion J, Sohn H, Zwerling A, Perkins MD. Novel and improved technologies for tuberculosis diagnosis: progress and challenges. *Clin. Chest Med*. 2009; 30: 701–716.

Palomino JC, Leão SC, Ritacco V.[editores]. *Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care*. [Data de acesso: 15/04/2009]. Disponível em:

<http://www.tuberculosis textbook.com/tb/tbhiv.htm> acesso 17 agosto 2010

Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 56(2): 102-11.

Pena SDJ, Barreto G, Vago AR, De Marco L, Reinach FC, Dias Neto E, et al. Sequence-specific “gene signatures” can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91: 1946-1949.

Piatek A S, Tyagi S, Pol A C, Telenti A, Miller L P, Kramer F R, et al.. Molecular beacons sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Biotechnology* 1998; 16: 359-363

Piatek AS, Telenti A, Murray MR, El-Hajj H, Jacobs Jr WR, et al.. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: Implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 103-110.

Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. 1998 update. *Tuber Lung Dis*. 1998; 79: 3-29.

Ribeiro L. Tisiólogos ilustres. Rio de Janeiro: Sul Americana, 1955.

Riska PF, Jacobs Jr WR, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000; 4: S4-S10.

Rocha JL, Dalcolmo MP, Borga L, Fedele D, Marques MG. Tuberculose multirresistente. *Pulmão RJ*. 2008; 17(1): 27-32. [Data de acesso: 03/08/2011]. Disponível em: <http://www.sopterj.com.br/tuberculose/curso/8.pdf>

Rodrigues ILA, Monteiro LL, Pacheco RHBP, Silva SED. Abandono do tratamento de tuberculose em co-infectados TB/HIV. *Rev Esc Enferm USP*. 2010; 44(2): 383-7.

Rosemberg J. *Boletim de Pneumologia Sanitária*. Julho/Dezembro de 1999, vol 7(2).

Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijk O, Jannes G, De Rijk P, et al. 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. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1997; 41 (10): 2093-2098.

Rossetti MLR, Valim ARM, Silva MSN, Rodrigues VS. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Resistant tuberculosis: a molecular review*. *Rev Saúde Pública* 2002; 36: 525-32.

Rouse DA, Li Z, Bai G-H, Morris SL. Characterization of the *katG* and *inhA* Genes of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium*

tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995; 39(11): 2472-2477.

Ruffino Netto A. Impacto da reforma do Setor Saúde sobre os serviços da Tuberculose no Brasil. *Boletim de Pneumologia Sanitária*. 1999; 7(1): 7-18.

Ruiz M, Torres M J, Llanos A C, Arroyo A, Palomares J C, Aznar J. Direct detection of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in auramine-rhodamine-positive sputum specimens by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1585-1589.

Sambrook J, Russel DW. Agarose gel eletrophoresis . In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3<sup>a</sup> Ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001; Cap.7: 7.9-7.12 e 7.43-7.45.

Santos LAR e Galesi VMN. Mudança no esquema de tratamento da tuberculose. *Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)*, [online]. 2010; 7 (73): 28-32.

Seiscento M, Vargas FS, Rujula MJP, Bombarda S, Uip DE, Galesi VMN. Aspectos epidemiológicos da tuberculose pleural no estado de São Paulo (1998-2005). [Artigo Original]. *J Bras Pneumol*. 2009; 35(6): 548-554

Shi R, Otomo K, Yamanda H, Tatsumi T, Sugawara I. Temperature-mediated heteroduplex analysis for the detection of drug-resistant gene mutations in clinical isolation of *Mycobacterium tuberculosis* by denaturing HPLC, SURVEYOR nuclease. *Microbes Infect*. 2006; 8: 128-135.

Silva EAM, Sato DN, Telles, MAS, Martins MC, Palaci M, Ueki SYM. Perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* no Estado de São Paulo, 1986 a 1990. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 199; 252: 37-40.

Small PM; Shafer RW; Hopewell PC; Singh SP; Murphy MJ; Desmond E et al. Exogenous re-infection with multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. N Engl J Med. 1993; 328: 1137–44.

Salomon N; Perlman DC; Friedmann P; Buschestein S; Kreiswirth BN e Mildvan D. Predictors and outcome of multidrug resistant tuberculosis. Clin Infect Dis. 1995; 21: 1245–52.

Takahashi T, Nakayama T. Novel technique of quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA. J Clin Microbiol. 2006; 44(3): 1029-39.

Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B et al. Cloning and Nucleotide Sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB Genes and Detection of Quinolone Resistance Mutations. 1994; 38(4): 773-80.

Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Matter L, Schopfer K, Bodmer T, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Cole S. Detection of Rifampicin - resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. 1993; 341: 647-650.

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 1993; 31: 175-178.

Telenti A, Honore N, Bernasconi C, March J, Ortega A, Heym B, Takiff HE, Cole ST. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratorial level. J Clin Microbiol. 1997; 35: 719-723.

Telenti A. Genetics of drug resistance in tuberculosis. Clinics in Chest Med. 1997; 18(1): 55-64

Torres JM, Criado A, Palomares JC e Aznar J. Use of Real-Time PCR and Fluorimetry for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance-Associated Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2000; 38(9): 3194-3199.

Torres J M, Criado A, Ruiz M, Llanos A C, Palomares J C, Aznar J. Improved real-time PCR for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Diag Microbiol and Infec Dis. 2003; 45: 207-212.

Traore H, Fissette K, Bastian I, Devleeschouwer M, Portaels F. Detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a comercial line probe assay as an initial indicator of multidrug resistance. Int J Tuberc Lung. 2000; 4: 481–484.

Tudó G, Gonzalés J, Obama R, Rodriguez JM, Franco JR, Espasa M., et al.. Study of resistance to anti-tuberculous drugs in five districts of Equatorial Guinea: rates, risk factors, genotyping of gene mutations and molecular epidemiology. Int J Tuberc Lung Dis. 2004; 8: 15-22.

Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. Nature Biotechnology. 1998; 16: 49-53.

Valim A R M, Rossetti M L R, Ribeiro M O, Zaha A. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brasil. J Clin Microbiol 2000; 38: 3119-3122.

van Doorn H R, Class E C, Templeton K E, van de Zaden A G, te Koppele Vije A, de Jong M D, et al.. Detection of a point mutation associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by Real-Time PCR technology with 3´-minor groove binder-DNA probes. J Clin Microbiol 2003; 41: 4630-4635.

van Soolingen D, Hass P E W, van Door H R, Kuijper E, Rinder H, Borgdorff M W. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. Concise Communication. J Infec Dis 2000; 182: 1788-90.

Vareldzis BP, Grosset J, Kantor I, Crofton J, Laszlo A, Felten M, et al.. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. Tuber Lung Dis. 1994; 75: 1-7  
(*apud* WHO/TB/84,143.Geneva:World Health Organization, March 15, 1984).

Wada T, Maeda S, Tamaru A, Imai S, Hase A, Kobayashi K. Dual-Probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Real-Time PCR. J Clin Microbiol. 2004; 42: 5277-5285.

Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, Crawford JT, Portaels F, Salfinger M, et al.. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 1994; 38: 2380-2386.

Williams DL, Spring L, Gillis TP. Evaluation of a Polymerase Chain Reaction–Based Universal Heteroduplex Generator Assay for Direct Detection of Rifampin Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* from Sputum Specimens. Clin Inf Dis. 1998; 26: 446-50.

World Health Organization (WHO). Update Tuberculosis Facts A3. Global Tuberculosis Control report 2009. A short update to the 2009 report [ Data de acesso: 20/08/2010]. Disponível em:

[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2009/update/tb\\_9.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/tb_9.pdf)

World Health Organization (WHO). Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB). 2010 GLOBAL REPORT ON SURVEILLANCE AND

RESPONSE. [Data de Acesso: 20/08/2010]. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf)

Wu X-q, Lu Y, Zhang J-x, Liang J-q, Li H-m, Zhang G-y. Detection of the mutations in *katG*315 and *inhA*-15 of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Chinese patients. Chinese Medical Journal. 2006; 119(3): 230-233.

Yesilkaya H, Meacci F, Niemann S, Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Long Drug Study Group, et al.. Evaluation of molecular-beacon, TaqMan, and fluorescence resonance energy transfer probes for detection of antibiotic resistance-conferring single nucleotide polymorphisms in mixed *Mycobacterium tuberculosis* DNA extracts. J Clin Microbiol 2006; 44: 3826-3829.

Zhang Y, Garbe T, Young D. Transformation with *katG* restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates to a range of drugs concentrations. Mol Microbiol.1993; 8: 521-524.

Zhang SL, Shen JG, Xu PH, Li DX, Sun ZQ, Li L, et al.. A novel genotypic test for rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by a multiplex probe assay. J Applied Microbiology. 2007; 103: 1262-1271.



## Anexo 1. Encaminhamento a Comitê de Ética externo



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
Coordenadoria de Controle de Doenças  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
DIVISÃO DE BIOLOGIA MÉDICA  
SERVIÇO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA



São Paulo, 01 de Outubro de 2008

Ilmo Sr.  
Prof. Dr Claudio Leone  
Coordenador do Comitê de Ética da Faculdade de Saúde Pública/USP

Prezado Prof. Leone,

Encaminhamos a VSa, uma cópia do projeto de pesquisa “Perfil Mutacional dos Genes Responsáveis pela Resistência de *Mycobacterium tuberculosis* a rifampicina (*rpoB*) e isoniazida (*katG*) em Cepas Isoladas no Estado de São Paulo e avaliação do Uso da PCR em Tempo-Real para a Detecção Rápida Destas Mutações”, a ser desenvolvido no Instituto Adolfo Lutz sob a coordenação do Dr. Claudio Tavares Sacchi, solicitando que o mesmo seja submetido ao Comitê de Ética da Faculdade de Saúde Pública da USP (FSP/USP). Quero informar que este projeto já possui aprovação da Comissão Científica do Instituto Adolfo Lutz, em anexo.

Tal solicitação se justifica pelo fato do Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz, estar com suas atividades temporariamente suspensas e porque dois dos pesquisadores envolvidos neste projeto, professores Glavur Rogério Matté e Maria Helena Matté são docentes do Departamento de Epidemiologia da FSP/USP.

Certa de poder contar com sua colaboração agradeço antecipadamente, colocando-me a disposição para as informações complementares que se fizerem necessárias.

Atenciosamente,

Julia Maria Souza de Felipe

Diretora da Divisão de Biologia Médica  
Instituto Adolfo Lutz

## Anexo 2. Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Saúde Pública

Of.COEP/ 265 / 08

08 de OUTUBRO de 2008.

Prezado(a) Orientador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - COEP analisou de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96 e suas complementares, o protocolo de pesquisa intitulada PERFIL MUTACIONAL DOS GENES RESPONSÁVEIS PELA RESISTÊNCIA DE *Mycobacterium tuberculosis* A RIFAMPICINA (rpoB) E ISONIAZIDA (katG) EM CEPAS ISOLADAS NO ESTADO DE SÃO PAULO" sob coordenação do Prof. Dr. Cláudio Tavares Sacchi e considerou que o projeto não envolve seres humanos.

Atenciosamente,

Cláudio Leone

Professor Associado

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – FSP/COEP

Ilm.º Sr.º  
Prof.º Dr.º JULIA MARIA SOUZA DE FELIPE  
M.D. DIRETORA DA DIVISÃO DE BIOLOGIA MÉDICA  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

## Anexo 3. Custos

### Análise de custos diretos dos ensaios de RT-PCR e MGIT 960/Novembro 2010

Custo por Exame		
US\$=1.7 Reais		
	SIRE	RT-PCR
<b>I - Material de Consumo</b>		
Ponteiras	1,00	1,00
Qiagen		5,00
Placas		0,12
Caps		0,05
Sonda		0,39
M Mix		4,25
Diversos	1,00	1,00
Controles		0,83
SIRE	117,60	
* PNB	1,00	
Total em U\$ Dollar	<b>120,60</b>	<b>12,64</b>
Total em Reais 1,7	<b>205,02</b>	<b>21,49</b>

#### CÁLCULOS POR EXAME EM REAIS(RT-PCR)

12,64 por exame= R\$ 21,49	
a) 2 Principais sítios INH/RIF: 315 <i>katG</i> e 531 <i>rpoB</i> = 42,98	42,96
Total	42,96

#### TODOS OS ALVOS

b) INH (315 <i>katG</i> + <i>inhA</i> ) =2X21,49= 42,96	42,96
b) RIF(SW182+SW112 e SW89+SW111), 2 duplex=42,98	42,96
Total	85,92

#### ANÁLISE DO TOTAL GERAL

	RT-PCR		MGIT 960
	OPÇÕES RT-PCR em R\$		
	a	b	
988 CEPAS ANALISADAS			R\$ 205,02
R\$	42.444,48	84.888,96	202.559,76

#### **Anexo 4. Comunicação pessoal (Dra. ROSÂNGELA SIQUEIRA DE OLIVEIRA).**

Levantamento de resultados de MGIT 960 no primeiro semestre de 2010, no total de 216 isolados encaminhados para realização do TSA no Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses-NTM (Centro de Bacteriologia) do Instituto Adolfo Lutz-São Paulo.

TIPO DE RESISTÊNCIA	NÚMERO DE CULTURAS	PORCENTAGEM
EIPR	1	0,5%
EIR	3	1,5%
I	76	35,0%
IP	2	1,0%
IPR	12	5,5%
IR	34	15,5%
P	2	1,0%
R	12	5,5%
S	41	19,0%
SEIPR	2	1,0%
SEIR	2	1,0%
SI	5	2,5%
SIP	4	2,0%
SIPR	5	2,5%
SIR	15	7,0%
Total Geral	216	100,0%

E: Etambutol; I: Isoniazida; P: Pirazinamida; R: rifampicina; S: Estreptomina