

JULIANA MAIRA WATANABE PINHATA

Determinação do nível de resistência a isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e correlação com mutações nos genes que conferem resistência a este fármaco: *katG* e *inhA*

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof^a Dr^a Rosângela Siqueira de Oliveira

SÃO PAULO

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Pinhata, Juliana Maira Watanabe

Determinação do nível de resistência a isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e correlação com mutações nos genes que conferem resistência a este fármaco: katG e inhA/ Juliana Maira Watanabe Pinhata. -2020.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Rosângela Siqueira de Oliveira.

1. Isoniazida/uso terapêutico. 2. *Mycobacterium tuberculosis*/classificação. 3. Resistência microbiana a medicamentos. 4. Rifampina/uso terapêutico. 5. Sequência de bases. 6. Tuberculose resistente a múltiplos medicamentos/diagnóstico.

SES/CCD/CD-406/2020

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Yoshiko e Francisco, e ao meu irmão, João Eduardo, pela
parceria nesta bela caminhada que é a vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

À Dr^a Rosângela Siqueira de Oliveira, pelos valiosos ensinamentos, amizade e confiança.

À Dr^a Michelle Christiane da Silva Rabello, da Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, pelo auxílio e disponibilização do laboratório para a realização da técnica de sequenciamento de Sanger.

À Dr^a Maria Gisele Gonçalves por ceder gentilmente os dados de sua dissertação de mestrado.

À bióloga Flávia Mendes, bolsista FEDIAL, por todo o auxílio e dedicação à realização deste projeto.

À Lucilaine Ferrazoli, pelo auxílio nas análises dos resultados de tipagem por RFLP, pelos valiosos ensinamentos e contínuo incentivo e apoio à minha carreira.

À Ângela Brandão, pela amizade, parceria e pelo auxílio nas análises dos resultados de sequenciamento.

À Kelen Ghisi, Juliana Failde e Vera Simonsen, pelo auxílio na realização da tipagem molecular por RFLP.

À Tânia Matsui, pelo compartilhamento de dados de sequenciamento e pela amizade.

À Erica Chimara, diretora do Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses, pelo apoio a minha carreira e à realização deste doutorado mesmo durante minha jornada de trabalho.

A toda a equipe do Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses pela excelência do trabalho, pois sem a realização dos exames de rotina, não haveria pesquisa.

Às colegas Ana Paula Lemos e Samanta Almeida, pelo empréstimo de equipamentos e pelas conversas gratificantes.

Aos amigos da Bacteriologia Roberta Morozetti, Kelen Ghisi, Sérgio Bokermann e Maria Luiza Guerra, e às coleguinhas Maria Fernanda Bueno, Gabriela Rodrigues Francisco, Ana Paula Cassiolato, Natália Fernandes, Juliana Failde e Laís Tavares, pelos momentos de descontração, apoio, desabafo e amizade.

À Leyva Cecília Vieira de Melo, minha irmã e companheira de aventuras.

À Janaína Silva Micheletto, pela amizade e parceria desde os tempos de faculdade.

À Miriam Rodriguez Fernandes, pela amizade verdadeira e companheirismo.

À minha prima Mariana Montemor, pela amizade e participação nos ensaios do Samby e Junior.

À minha cunhada e neurocientista Maria Carolina B. Gonçalves, por fazer parte da família e engrandecer o campo da ciência feita por mulheres.

À Ângela (Tata), por cuidar de mim desde pequena e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao Caio Macedo, meu amor e parceiro para toda a vida.

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 17/16082-7) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

A tuberculose (TB) resistente aos fármacos é um problema mundial. As mutações mais frequentes associadas à resistência à isoniazida em *Mycobacterium tuberculosis* ocorrem no códon 315 do gene *katG*, causando níveis moderados a altos de resistência, e na região promotora do gene *inhA*, associadas a baixos níveis de resistência. Mutações no gene *rpoB* associam-se à resistência à rifampicina. Este estudo analisou mutações nos genes *katG*, *inhA* e *rpoB* e níveis fenotípicos de resistência à isoniazida em isolados de *M. tuberculosis* de pacientes com TB resistente do estado de São Paulo, no período de outubro/2008 a março/2009 e no ano de 2016. Dos 374 isolados analisados, 165 (44%) eram monorresistentes à isoniazida, 47 (13%) polirresistentes (resistentes à isoniazida+fármaco(s) de 1ª linha exceto rifampicina), 122 (33%) multirresistentes (MR), 24 (6%) pré-extensivamente resistentes (pré-XDR) e 16 (4%) XDR. Entre os isolados com a mutação Ser315Thr no *katG*, 99,4% apresentaram resistência intermediária ou alta à isoniazida, enquanto 73,7% dos isolados com a mutação C-15T no *inhA* apresentaram baixa resistência. Dos isolados com mutações no *katG* e *inhA*, 66,6% mostraram resistência alta e 32,4% resistência intermediária. Observou-se que 58,8% dos isolados tipados estavam em cluster e 43,7% deles pertenciam aos cinco clusters mais prevalentes encontrados: SP5, SP2c, SP12, SP5ac e SP1i. Isolados com mutações no *katG* 315 estavam com maior frequência em cluster quando comparados aos isolados com outras mutações no *katG* ou sem mutações ($p=0,002$ e $p=0,01$, respectivamente). Isolados com a mutação C-15T no *inhA* se mostraram com maior frequência em cluster quando comparados aos isolados com mutações no *katG* 315 ($p=0,006$). Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as taxas de cura dos pacientes com TB monorresistente à isoniazida e TB-MR (63,4% vs 47,1%, $p=0,02$), assim como entre os pacientes com TB monorresistente à isoniazida e TB-XDR (63,4% vs 12,5%, $p=0,01$). Os pacientes com TB polirresistente também apresentaram taxas de cura maiores do que os pacientes com TB-MR (70% vs 47,1%, $p=0,02$) e do que os pacientes com

TB-XDR (12,5%, $p=0,004$). Em conclusão, as mutações no *katG* estão associadas a níveis elevados de resistência à isoniazida e as mutações no *inhA* ocorreram com maior frequência em isolados com resistência em menor nível. Houve transmissão da TB resistente entre os pacientes do estado de São Paulo, cujas taxas de cura foram relativamente baixas.

Palavras-chave: isoniazida, *Mycobacterium tuberculosis*, resistência microbiana a medicamentos, rifampina, sequência de bases, tuberculose resistente a múltiplos medicamentos

ABSTRACT

Drug-resistant tuberculosis (TB) is a problem worldwide. The most frequent mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates occur in codon 315 of the *katG* gene, which have been associated with moderate- to high-levels of resistance, and in the promoter region of the *inhA* gene, causing low-level isoniazid resistance. In its turn, the *rpoB* gene is associated with resistance to rifampicin. This study analyzed mutations in *katG*, *inhA* and *rpoB* genes and phenotypic levels of isoniazid resistance in *M. tuberculosis* isolates from drug-resistant TB patients from the state of São Paulo, in the period of October 2008 to March 2009 and during the year of 2016. Of the 374 *M. tuberculosis* isolates analyzed 165 (44%) were mono-resistant to isoniazid, 47 (13%) polydrug-resistant (resistant to isoniazid+1st line drug(s) except rifampicin), 122 (33%) multidrug-resistant (MDR), 24 (6%) pre-extensively drug-resistant (pre-XDR) and 16 (4%) XDR. Among isolates with the *katG* Ser315Thr mutation, 99.4% had intermediate or high-level isoniazid resistance, while 73.7% of the isolates with the *inhA* C-15T mutation had low-level resistance. Among isolates with mutations in *katG* and *inhA*, 66.6% had high-level resistance and 32.4% had intermediate resistance. It was observed that 58.8% of the isolates submitted to typing were clustered, and 43.7% of them belonged to the five most prevalent clusters: SP5, SP2c, SP12, SP5ac and SP1i. Isolates with *katG* 315 mutations were more frequently clustered when compared to isolates with other *katG* mutations or with no mutations ($p= 0.002$ and 0.01 , respectively). Isolates with the *inhA* C-15T mutation were more frequently clustered when compared to isolates with *katG* 315 mutations ($p= 0.006$). Statistically significant differences were found between cure rates of isoniazid-mono-resistant TB patients and MDR-TB patients (63.4% vs 47.1%, $p= 0.02$), as well as between isoniazid-mono-resistant TB patients and XDR-TB patients (63.4% vs 12.5%, $p= 0.01$). Patients with polydrug-resistant TB also had higher cure rates than patients with MDR-TB (70% vs 47.1%, $p= 0.02$) and XDR-TB (12.5%, $p= 0.004$). The present study showed that *katG* mutations are associated with higher levels of isoniazid resistance and *inhA*

mutations are found in isolates with lower resistance levels. In addition, drug-resistant TB was transmitted among patients from the state of São Paulo, whose cure rates were relatively low.

Keywords: base sequence; drug resistance, microbial; isoniazid; *Mycobacterium tuberculosis*; rifampin; tuberculosis, multidrug-resistant

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|--|
| µg | Micrograma (10 ⁻⁶ grama) |
| µL | Microlitro (10 ⁻⁶ litro) |
| µm | Micrômetro (10 ⁻⁶ metro) |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BAAR | Bacilos álcool-ácido resistentes |
| BCG | Bacilo de Calmette-Guérin |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| C | Citosina |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| CIM | Concentração inibitória mínima |
| CMT | Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| CTC | Conselho Técnico Científico |
| CVE | Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| dNTPs | Desoxirribonucleotídeos fosfatados |
| DR | <i>Direct repeat</i> |
| E | Etambutol |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| Et | Etionamida |
| G | Guanina |
| h | Horas |
| H | Isoniazida |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana |
| IAL | Instituto Adolfo Lutz |
| IS | <i>Insertion sequence</i> |
| LPA | <i>Line probe assay</i> |
| min | Minuto(s) |
| MIRU-VNTR | <i>Mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats</i> |

| | |
|---------|---|
| mL | Mililitro (10^{-3} litro) |
| mM | Milimolar (10^{-3} molar) |
| MGIT | <i>Mycobacteria growth indicator tube</i> |
| NADH | Nicotinamida-adenina-dinucleotídio |
| ng | Nanograma (10^{-9} grama) |
| NGS | <i>Next-generation sequencing</i> |
| nm | Nanômetro (10^{-9} metro) |
| nM | Nanomolar (10^{-9} molar) |
| NTM | Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses |
| OADC | Ácido oléico, albumina, dextrose e catalase |
| °C | Graus Celsius |
| O | Ofloxacina |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| pb | Pares de base |
| PAS | Ácido p-aminossalicílico |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| pmol | Picomol (10^{-12} mol) |
| PK/PD | Farmacocinética/farmacodinâmica |
| PNB | Ácido p-nitrobenzóico |
| qsp | Quantidade suficiente para |
| R | Rifampicina |
| RFLP | <i>Restriction-fragment-length polymorphism</i> |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RNAM | Ácido ribonucléico mensageiro |
| rpm | Rotação por minuto |
| RRDR | <i>Rifampicin-resistance determining region</i> |
| s | Segundo(s) |
| S | Streptomomicina |
| SITE-TB | Sistema de Informação de Tratamentos Especiais da Tuberculose |
| SP | São Paulo |
| T-NGS | <i>Targeted next-generation sequencing</i> |

| | |
|----------------------|--|
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TB | Tuberculose |
| TBE | Tris-Borato-EDTA |
| TB-MR | Tuberculose multirresistente |
| TB pré-XDR | Tuberculose pré-extensivamente resistente |
| TB-RR | Tuberculose resistente à rifampicina |
| TB-WEB | Sistema de Notificação e Acompanhamento dos Casos de Tuberculose |
| TB-XDR | Tuberculose extensivamente resistente |
| <i>T_m</i> | Temperatura de <i>melting</i> |
| Trd | Terizidona |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| UPGMA | <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i> |
| V | Volts |
| WGS | <i>Whole genome sequencing</i> |
| Z | Pirazinamida |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Número e proporção dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> incluídos no estudo de acordo com o ano de recebimento pelo Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses | 69 |
| Tabela 2. Origem de isolamento dos 374 isolados de <i>M. tuberculosis</i> incluídos no estudo | 70 |
| Tabela 3. Distribuição dos 374 isolados de <i>M. tuberculosis</i> correspondentes aos 303 pacientes incluídos no estudo | 71 |
| Tabela 4. Perfil de resistência aos fármacos de 2ª linha dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> extensivamente resistentes..... | 72 |
| Tabela 5. Tipos de mutação no códon 315 do gene <i>katG</i> apresentados pelos 177 isolados de <i>M. tuberculosis</i> | 77 |
| Tabela 6. Tipos de mutação apresentados pelos 118 isolados de <i>M. tuberculosis</i> com mutação na região promotora do gene <i>inhA</i> | 78 |
| Tabela 7. Tipos de mutação encontrados nos 43 isolados de <i>M. tuberculosis</i> submetidos ao sequenciamento dos genes <i>katG</i> e <i>inhA</i> inteiros..... | 78 |
| Tabela 8. Tipos de mutação encontrados nos 173 isolados de <i>M. tuberculosis</i> com mutação na região determinante de resistência à rifampicina do gene <i>rpoB</i> | 80 |
| Tabela 9. Mutações na região determinante de resistência à rifampicina do gene <i>rpoB</i> identificadas por sequenciamento de Sanger nos 28 isolados de <i>M. tuberculosis</i> com mutações inferidas pelo teste GenoType MTBDR _{plus} | 81 |
| Tabela 10. Tipos de mutação no gene <i>rpoB</i> identificados nos isolados de <i>M. tuberculosis</i> com resultados discordantes quanto à resistência fenotípica à rifampicina..... | 82 |
| Tabela 11. Mutações e níveis fenotípicos de resistência à isoniazida detectados nos 367 isolados de <i>M. tuberculosis</i> analisados..... | 84 |
| Tabela 12. Histórico das variações nos perfis fenotípicos e genotípicos de resistência dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> de 23 pacientes..... | 87 |
| Tabela 13. Perfis de RFLP-IS6110 dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> de acordo com o período de recebimento no NTM..... | 91 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 14. Mutações nos genes <i>katG</i> e <i>inhA</i> encontradas nos isolados de <i>M. tuberculosis</i> contidos nos cinco clusters mais prevalentes encontrados no estudo | 96 |
| Tabela 15. Relação entre mutações nos genes <i>katG</i> e <i>inhA</i> e distribuição em clusters dos 276 isolados de <i>M. tuberculosis</i> incluídos na análise..... | 96 |
| Tabela 16. Características sociodemográficas e clínicas dos 299 pacientes com tuberculose resistente notificados no sistema TB-WEB | 98 |
| Tabela 17. Mutações nos genes <i>katG</i> e <i>inhA</i> dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> correspondentes aos 299 pacientes notificados, de acordo com o tipo de caso | 100 |
| Tabela 18. Taxas de cura de acordo com o tipo de caso dos 299 pacientes com tuberculose resistente notificados | 101 |
| Tabela 19. Desfechos de tratamento dos 303 pacientes incluídos no estudo, de acordo com o perfil de resistência dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> | 102 |
| Tabela 20. Desfechos de tratamento dos pacientes com tuberculose monorresistente à isoniazida incluídos no estudo..... | 104 |
| Tabela 21. Mutações encontradas nos isolados de <i>M. tuberculosis</i> dos 37 pacientes com tuberculose monorresistente à isoniazida que foram tratados com o esquema I ou esquema básico e apresentaram cura..... | 105 |
| Tabela 22. Desfechos de tratamento dos pacientes com tuberculose polirresistente incluídos no estudo | 106 |
| Tabela 23. Desfechos de tratamento dos pacientes com tuberculose multirresistente incluídos no estudo | 107 |
| Tabela 24. Desfechos de tratamento dos pacientes com tuberculose pré-extensivamente resistente incluídos no estudo..... | 108 |
| Tabela 25. Desfechos de tratamento dos pacientes com tuberculose extensivamente resistente incluídos no estudo..... | 109 |
| Tabela 26. Taxas de cura dos 295 pacientes notificados* de acordo com o nível de resistência à isoniazida dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> | 110 |
| Tabela 27. Taxas de cura dos 295 pacientes notificados* de acordo com as mutações encontradas nos genes <i>katG</i> e <i>inhA</i> nos isolados de <i>M. tuberculosis</i> | 111 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura da parede celular das micobactérias | 15 |
| Figura 2. Fluxograma do delineamento do estudo | 52 |
| Figura 3. Equipamento Twincubator | 57 |
| Figura 4. Ficha para registro e análise de resultados do teste GenoType MTBDR <i>plus</i> 2.0..... | 58 |
| Figura 5. Representação esquemática das fitas do kit GenoType MTBDR <i>plus</i> 2.0 com as sondas para os genes <i>rpoB</i> , <i>katG</i> e <i>inhA</i> | 59 |
| Figura 6. Perfil de resistência fenotípica dos 374 isolados de <i>M. tuberculosis</i> incluídos no estudo | 71 |
| Figura 7. Perfil fenotípico de resistência e níveis de resistência à isoniazida dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> | 74 |
| Figura 8. Perfil fenotípico de resistência e proporções das mutações encontradas nos genes <i>katG</i> , <i>inhA</i> e <i>rpoB</i> | 76 |
| Figura 9. Perfis de RFLP-IS6110 dos isolados encontrados em cluster | 94 |
| Figura 10. Perfil de resistência dos 303 isolados de <i>M. tuberculosis</i> correspondentes aos 303 pacientes incluídos no estudo..... | 97 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Classificação dos fármacos anti-tuberculose | 38 |
| Quadro 2. Esquemas de tratamento recomendados para tuberculose monorresistente à isoniazida..... | 40 |
| Quadro 3. Esquemas de tratamento para tuberculose polirresistente, 2011 | 41 |
| Quadro 4. Esquemas de tratamento para tuberculose polirresistente, 2019 | 42 |
| Quadro 5. Medicamentos recomendados para o tratamento da tuberculose resistente à rifampicina, multirresistente e extensivamente resistente..... | 43 |
| Quadro 6. Esquemas de tratamento para tuberculose multirresistente | 44 |
| Quadro 7. Grupos de medicamentos recomendados pela Organização Mundial da Saúde para utilização nos esquemas de tratamento para tuberculose multirresistente | 45 |
| Quadro 8. Esquema de tratamento para tuberculose extensivamente resistente | 46 |
| Quadro 9. Localização das mutações nos genes <i>rpoB</i> , <i>katG</i> e <i>inhA</i> e as bandas selvagens e mutantes correspondentes detectadas pelo kit GenoType MTBDR <i>plus</i> 2.0 | 60 |
| Quadro 10. Sequências dos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes <i>katG</i> , <i>inhA</i> e <i>rpoB</i> de isolados de <i>M. tuberculosis</i> | 62 |

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1. Gênero <i>Mycobacterium</i> | 14 |
| 1.2. Epidemiologia da TB | 16 |
| 1.3. Histórico do tratamento anti-TB | 18 |
| 1.4. Resistência de <i>M. tuberculosis</i> aos fármacos | 19 |
| 1.4.1. Isoniazida | 20 |
| 1.4.2. Rifampicina | 23 |
| 1.5. Detecção da resistência de <i>M. tuberculosis</i> aos fármacos | 24 |
| 1.5.1. Métodos fenotípicos | 24 |
| 1.5.2. Teste de sensibilidade quantitativo | 28 |
| 1.5.3. Métodos moleculares baseados na detecção de alterações na sequência de ácidos nucleicos | 29 |
| 1.6. Epidemiologia molecular | 35 |
| 1.7. Esquemas de tratamento para TB | 37 |
| 1.7.1. Monorresistência à isoniazida | 39 |
| 1.7.2. Polirresistência | 41 |
| 1.7.3. Multirresistência | 42 |
| 1.7.4. TB extensivamente resistente | 45 |
| 1.7.5. Esquemas de tratamento individualizados | 46 |
| 2. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA DO PROJETO | 47 |
| 3. OBJETIVOS | 49 |
| 3.1. Objetivo geral | 49 |
| 3.2. Objetivos específicos | 49 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 50 |
| 4.1. Isolados de <i>M. tuberculosis</i> resistentes à isoniazida | 50 |
| 4.2. Procedimentos laboratoriais | 53 |
| 4.2.1. Cultivo dos isolados | 53 |
| 4.2.2. Teste de sensibilidade quantitativo à isoniazida pelo método BACTEC MGIT 960 | 54 |
| 4.2.3. Extração de DNA | 55 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.4. Detecção de mutações pelo kit GenoType MTBDR <i>plus</i> 2.0 (Hain Lifescience, Alemanha)..... | 56 |
| 4.2.5. Sequenciamento de DNA | 61 |
| 4.2.6. Tipagem molecular por RFLP-IS6110..... | 64 |
| 4.2.7. Fontes de dados | 65 |
| 4.2.8. Análise dos dados..... | 67 |
| 5. RESULTADOS..... | 69 |
| 5.1. Perfil de resistência fenotípico dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> aos fármacos de 1ª e 2ª linha | 69 |
| 5.2. Nível de resistência à isoniazida dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> testados pelo método quantitativo automatizado BACTEC MGIT 960..... | 73 |
| 5.3. Perfil das mutações nos genes <i>katG</i> e <i>inhA</i> e na RRDR do gene <i>rpoB</i> | 74 |
| 5.4. Associação entre mutações nos genes <i>katG</i> e <i>inhA</i> e níveis fenotípicos de resistência à isoniazida..... | 82 |
| 5.5. Evolução da resistência fenotípica e genotípica | 84 |
| 5.6. Análise da tipagem molecular dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> por RFLP-IS6110 | 90 |
| 5.7. Análise dos dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais, e dos desfechos de tratamento dos pacientes..... | 97 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 112 |
| 7. CONCLUSÕES | 126 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 128 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* pertence à família *Mycobacteriaceae*, Subordem *Corynebacterineae*, Ordem *Actinomycetales* e é constituído atualmente por 199 espécies e 14 subespécies (Euzéby, 2019). Este gênero é composto por microrganismos que possuem um alto teor de G+C (61-71%) no DNA, além de uma grande quantidade de lipídeos na parede celular (Barrera, 2007; Pfyffer, 2007). As micobactérias são bacilos pleomórficos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis, não encapsulados e não esporulados, medindo de 1 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura (Barrera, 2007).

Recentemente, foi proposta a divisão das espécies do gênero *Mycobacterium* em cinco gêneros distintos: *Mycobacterium*, *Mycolicibacterium*, *Mycolicibacter*, *Mycolicibacillus* e *Mycobacteroides*, de acordo com resultados de análises comparativas entre sequências dos genomas e de proteínas conservadas das micobactérias (Gupta et al., 2018). Segundo esta nova classificação, o gênero *Mycobacterium* agruparia, entre outras espécies, *M. leprae*, agente etiológico da hanseníase, bem como as espécies do complexo *M. tuberculosis* (CMT) (Gupta et al., 2018).

A estrutura da parede celular das micobactérias difere substancialmente da parede de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Na membrana plasmática das micobactérias se encontram ancorados lipoproteínas, manosídios de fosfatidilinositol e lipoarabinomanano. A camada de peptidoglicano forma a base sobre a qual se ligam arabinogalactanos, que são polissacarídeos ramificados formados por D-arabinose e D-galactose, formando uma rede. O resíduo terminal da D-arabinose é esterificado, formando ácidos micólicos hidrofóbicos de alto peso molecular, com moléculas glicolípídicas ligadas à superfície (Figura 1). Os componentes lipídicos compõem 60% do peso da parede celular dessas bactérias. Proteínas e porinas de transporte se encontram distribuídas pelas camadas da parede, constituindo 15% de seu peso (Murray et al., 2006; Alderwick et al., 2007).

Pelo fato da parede celular das micobactérias possuir grande variedade de ácidos micólicos, sua superfície é altamente hidrofóbica e estes microrganismos têm a capacidade de resistir ao ressecamento, desinfetantes, antibióticos e corantes. Uma vez coradas, as micobactérias não descoram com soluções álcool-ácidas; por este motivo, são denominadas bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (Pfyffer, 2007; Ministério da Saúde, 2008).

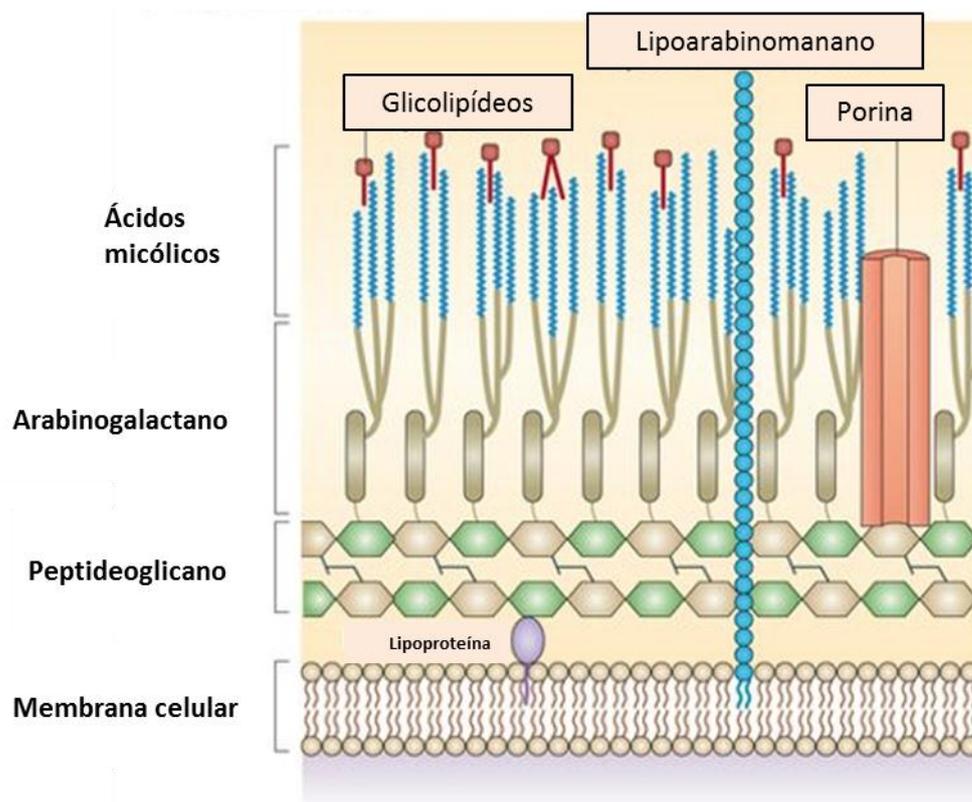


Figura 1. Estrutura da parede celular das micobactérias

Adaptado de Brown L et al. Nat Rev Microbiol. 2015; 13(10):620-30.

M. tuberculosis, principal agente etiológico da tuberculose (TB) em humanos, foi descoberto no ano de 1882 pelo cientista alemão Robert Koch. Esta bactéria cresce de forma lenta, dividindo-se a cada 12-24 h em temperatura ótima de 35-37°C (Ministério da Saúde, 2005; Pfyffer, 2007).

O CMT constitui um grupo geneticamente homogêneo, caracterizado pela similaridade de 99,9% em seu conteúdo nucleotídico (Velayati and Farnia, 2017). As espécies que compõem o CMT são *M. tuberculosis*, *M.*

bovis (*M. bovis* subsp. *bovis* e *M. bovis* BCG), *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii* e *M. pinnipedi* (Tortoli and Palomino, 2007). Outras espécies têm sido descritas como sendo altamente relacionadas ao complexo, como *M. suricattae*, *M. mungi*, *M. dassie* e *M. orygis* (Parsons et al., 2008; Alexander et al., 2010; Dawson et al., 2012; van Ingen et al., 2012; Dippenaar et al., 2015).

As espécies do CMT possuem hospedeiros, potencial zoonótico e reservatórios distintos. *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. canettii* são primariamente patogênicas em humanos. *M. bovis*, *M. microti* e *M. caprae* causam TB em animais e também podem ser transmitidas ao homem. *M. pinnipedii* foi isolada de focas e leões marinhos. Já as espécies *M. suricattae*, *M. dassie*, *M. orygis* e *M. mungi* foram isoladas de animais como suricatos, híraxes, órixes e mangustos, respectivamente (Velayati and Farnia, 2017).

1.2. Epidemiologia da TB

Segundo o relatório mais recente da Organização Mundial da Saúde (OMS), a TB é uma das dez maiores causas de morte no mundo, sendo que, em 2017, foi estimado que cerca de 10 milhões de pessoas contraíram a doença, 9% das quais estavam coinfectadas com o vírus do HIV (WHO, 2018a). Cerca de 1,7 bilhões de pessoas, o que corresponde a 23% da população mundial, tem infecção latente por TB, estando em risco de desenvolver a doença (WHO, 2018a).

Estima-se que 558.000 pessoas desenvolveram TB resistente à rifampicina (TB-RR), sendo que 82% (~458.000) delas tinham TB multirresistente (TB-MR), caracterizada pelo *M. tuberculosis* resistente à rifampicina e isoniazida, os fármacos de 1ª linha anti-TB mais efetivos no tratamento. Entre os casos de TB-MR, estima-se que 8,5% (~40.000) tenham a forma extensivamente resistente (XDR, do inglês *extensively drug-resistant*) da doença (WHO, 2018a), ou seja, quando o *M. tuberculosis* apresenta, além da resistência à rifampicina e isoniazida, resistência a pelo

menos um dos fármacos injetáveis de 2ª linha (como, por exemplo, amicacina, canamicina e capreomicina) e a uma fluoroquinolona (como, por exemplo, ofloxacina e levofloxacina), medicamentos-chave no tratamento da TB-MR.

Mundialmente, estima-se que 3,6% dos casos novos e 17% dos casos de retratamento tiveram TB-MR/RR em 2017. Com relação à resistência à isoniazida, estima-se que a média mundial seja de 7,1% em casos novos e 7,9% em casos previamente tratados (WHO, 2018a).

Ainda segundo a OMS, o Brasil está entre os 30 países responsáveis por 87% de todos os casos de TB no mundo e entre os 30 países que abrigam 88% do total de casos de TB/HIV (WHO, 2018a). Em 2017 foram notificados 72.770 casos novos de TB no país e, em 2016, foram registradas 4.483 mortes (Ministério da Saúde, 2019).

No estado de São Paulo, em 2018, foram notificados 18.572 casos novos de TB, resultando em uma incidência de 40,8 casos por 100 mil habitantes. Em 2017, foram registrados 909 óbitos no estado. Quanto à resistência aos fármacos, 88 pacientes tiveram TB monorresistente à isoniazida, 44 apresentaram TB-MR e 18 foram diagnosticados com TB-RR em 2018 (CVE, 2019).

Dados do II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos Anti-tuberculose, que ocorreu no Brasil no período de 2006-2009, mostraram um aumento na resistência primária tanto à isoniazida (de 4,4% para 6%) quanto à rifampicina (de 0,2% para 1,5%) (Dalcolmo, 2012). Em 2017, foram diagnosticados no país 246 casos novos de TB monorresistente (resistência a somente um fármaco de 1ª linha), 80 de TB polirresistente (resistência a mais de um fármaco de 1ª linha, exceto à combinação de isoniazida e rifampicina), 713 de TB-MR/RR e dois casos de TB-XDR (Ministério da Saúde, 2019).

1.3. Histórico do tratamento anti-TB

O tratamento quimioterápico da TB teve início na década de 1930 com as sulfonamidas, que, além de apresentarem alta toxicidade e insolubilidade, não se mostraram efetivas contra *M. tuberculosis*. Em 1945, a estreptomicina começou a ser utilizada com sucesso no tratamento. Pouco tempo depois, foram descobertos novos compostos com atividade anti-TB, como o ácido ρ -aminossalicílico (PAS) em 1946 e a isoniazida em 1952. Porém, o uso da estreptomicina e do PAS em monoterapia favoreceu o rápido surgimento da resistência de *M. tuberculosis* a esses compostos (Vilchèze and Jacobs Jr., 2014; Murray et al., 2015).

A introdução da isoniazida no tratamento representou um grande avanço, pois este fármaco era o mais potente à época, além de ter um baixo custo, ser bem tolerado e seguro. Inicialmente pensou-se que o tratamento somente com isoniazida seria efetivo, mas os pacientes tinham recidivas e desenvolviam resistência, demonstrando a importância da terapia com múltiplos fármacos (Murray et al., 2015).

Em 1959, o PAS e a isoniazida foram combinados em um tratamento com duração de 18 a 24 meses, que também incluía a estreptomicina nos primeiros seis meses. Este regime de tratamento com três fármacos foi utilizado durante quase 15 anos para todas as formas de TB. Apesar do sucesso deste regime, frequentemente os pacientes desistiam do tratamento devido a sua longa duração e aos efeitos colaterais (Vilchèze and Jacobs Jr., 2014; Murray et al., 2015).

Na década de 1960, experimentos mostraram que o etambutol era efetivo contra os bacilos resistentes à isoniazida e à estreptomicina, além de ser tão eficaz quanto o PAS quando administrado juntamente com a isoniazida. Após o descobrimento das rifamicinas em 1957, a rifampicina foi usada pela primeira vez no tratamento anti-TB em 1966, e sua combinação com isoniazida e etambutol possibilitou a diminuição do período de tratamento para nove meses, aumentando as taxas de cura (Murray et al., 2015).

Desde 1984, a inclusão da pirazinamida, descoberta na década de 1940, levou à criação do regime de tratamento recomendado atualmente pela OMS, com dois meses de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, seguidos por quatro meses de isoniazida e rifampicina (Vilchèze and Jacobs Jr., 2014; Murray et al., 2015).

1.4. Resistência de *M. tuberculosis* aos fármacos

A resistência genética em *M. tuberculosis* a um determinado fármaco é devida a mutações espontâneas que ocorrem uma vez a cada 10^{-6} a 10^{-8} replicações, em média. Sendo assim, a probabilidade de uma bactéria desenvolver resistência a três fármacos utilizados simultaneamente no tratamento é de 10^{-18} a 10^{-24} , ou seja, virtualmente inexistente (Zhang and Yew, 2009; Böttger, 2011). Tal conceito matemático embasa o uso de múltiplos fármacos no tratamento da TB, para que assim possa ser evitado o surgimento da resistência (Zhang and Yew, 2009).

A resistência em *M. tuberculosis* pode ser classificada em primária, a qual é observada em pacientes sem histórico de tratamento de TB e que, portanto, foram infectados por uma fonte com TB resistente; e adquirida ou secundária, verificada em pacientes com TB inicialmente sensível, que se torna resistente após exposição aos medicamentos (Dalcolmo et al., 2007).

M. tuberculosis se torna resistente aos fármacos quase que exclusivamente por alterações pontuais em seu genoma. Essas mutações pontuais conferem monorresistência (resistência a somente um fármaco) e o acúmulo gradual dessas alterações pode levar ao desenvolvimento de multirresistência, sendo que a seleção de isolados resistentes é favorecida pelo tratamento realizado de forma inadequada (Soini and Musser, 2001).

As mutações no genoma de *M. tuberculosis* podem alterar tanto a molécula-alvo do fármaco quanto enzimas responsáveis pela ativação ou modificação do antimicrobiano (Böttger, 2011).

1.4.1. Isoniazida

A resistência à isoniazida ocorre mais frequentemente do que aos outros fármacos, em uma frequência de um em 10^{5-6} bacilos *in vitro* (Zhang and Yew, 2009). A isoniazida é um dos fármacos de 1ª linha mais importantes para o tratamento da TB ativa e latente, com alta atividade bactericida e biodisponibilidade, baixo custo, excelente alcance intracelular, espectro de ação restrito e um bom perfil de segurança (Unissa et al., 2016). Estima-se que cerca de 8% dos pacientes com TB no mundo tenham TB resistente à isoniazida e sensível à rifampicina (WHO, 2018b).

A isoniazida é um pró-fármaco quimicamente conhecido como hidrazida do ácido isonicotínico (Unissa et al., 2016). Esta substância é ativa somente contra bacilos em multiplicação, não agindo sobre bacilos não-replicantes ou sob condições anaeróbias (Zhang and Yew, 2009).

A isoniazida entra na célula bacteriana através de difusão passiva simples e tem ação bacteriostática nas primeiras 24h de exposição a *M. tuberculosis*; após este período, o fármaco torna-se bactericida (Unissa et al., 2016). Por ser um pró-fármaco, a isoniazida precisa ser ativada para que se torne efetiva. Esta ativação é realizada pela enzima catalase-peroxidase KatG, a qual é codificada pelo gene *katG*. Após este processo, diversos tipos de radicais livres são formados, os quais são capazes de desabilitar muitos processos metabólicos em *M. tuberculosis* (Zhang and Yew, 2009; Unissa et al., 2016).

Quando ativada, a isoniazida interfere na síntese de ácidos micólicos da parede da micobactéria, inibindo a ação de diversas enzimas, entre elas a proteína carreadora de enoil-acil redutase InhA, codificada pelo gene *inhA* (Almeida da Silva and Palomino, 2011).

A diminuição e até mesmo a perda total da atividade catalase-peroxidase como resultado de mutações no gene *katG* são as alterações genéticas mais comuns associadas à resistência à isoniazida (Almeida da Silva and Palomino, 2011). Mais de 300 tipos de mutações no *katG* já foram descritos em isolados clínicos resistentes à isoniazida mundialmente; porém, a mutação mais frequente neste gene é a substituição do aminoácido serina

por treonina no códon 315 (Ser315Thr), a qual ocorre em 30 a 95% dos isolados resistentes à isoniazida (Vilchèze and Jacobs Jr., 2014). Também tem sido observado que isolados com mutações no *katG* apresentam nível moderado a alto de resistência, sendo capazes de crescer na presença de no mínimo 1 mg/L de isoniazida, sendo que os valores de concentração inibitória mínima (CIM) podem variar de 2 a >10 mg/L (Böttger, 2011).

A maioria das alterações no gene *inhA* ocorre na região promotora do óperon *mabA/inhA*, causando a superexpressão da enzima InhA. Também podem ocorrer mutações na região codificadora do gene *inhA*, causando alterações no sítio ativo da enzima e diminuindo sua afinidade à isoniazida (Zhang and Yew, 2009). Além da resistência à isoniazida, as mutações no *inhA* causam resistência à etionamida, fármaco de 2ª linha que tem estrutura química similar a da isoniazida (Almeida da Silva and Palomino, 2011).

A mutação mais frequente no *inhA* é a substituição da citosina por timina na posição -15 da região promotora (C-15T), mas outras substituições como T-8G/A e A-16G também foram observadas. Estas alterações causam um aumento nos níveis de RNAm, resultando na superexpressão da enzima InhA. Diversos outros tipos de mutações pontuais também foram observados no *inhA* e na região promotora em isolados resistentes à isoniazida e etionamida. Essas mutações estão associadas a baixos níveis de resistência (CIM de 0,2 a 1 mg/L). A mutação C-15T pode ser encontrada em até 35% dos isolados resistentes à isoniazida (Vilchèze and Jacobs Jr., 2014; Unissa et al., 2016).

Apesar das mutações nos genes *katG* e *inhA* serem as principais associadas à resistência à isoniazida, cerca de 15 a 25% de isolados resistentes a este fármaco não apresentam mutação nesses genes (Ramaswamy and Musser, 1998). Outros alvos nos quais foram encontradas mutações em isolados de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida são o gene *kasA* (que codifica a enzima β -cetoacil-ACP sintase, que participa da síntese de ácidos micólicos), a região intergênica *oxyR-ahpC*, o gene *ndh* (que

codifica a enzima NADH desidrogenase) e a região intergênica *furA-katG* (Ramaswamy et al., 2003).

Acredita-se que o gene *kasA* esteja relacionado a um baixo nível de resistência à isoniazida; no entanto, mutações neste gene também foram encontradas em isolados sensíveis, além de serem acompanhadas por mutações no *katG* e *inhA* em isolados resistentes (Unissa et al., 2016).

O gene *oxyR* codifica uma proteína regulatória do estresse oxidativo e não é funcional em *M. tuberculosis* devido a múltiplas deleções e mutações do tipo *frameshift*, que ocorrem quando há inserção ou deleção de nucleotídeos no DNA em número não múltiplo de 3, fazendo com que o quadro de leitura do RNAm seja deslocado, originando diversas mutações ao longo da cadeia polipeptídica. À jusante (*downstream*) do gene *oxyR* encontra-se o gene *ahpC* (Rv2428), que codifica uma alquil hidroperóxido redutase. Mutações na região intergênica *oxyR-ahpC* causam um aumento na expressão do gene *ahpC*, o que compensaria a perda da atividade da enzima catalase-peroxidase que ocorre em isolados resistentes à isoniazida com mutações no *katG* (Vilchèze and Jacobs Jr., 2014; Unissa et al., 2016). Entretanto, mutações nesse alvo têm sido encontradas tanto em isolados resistentes quanto em isolados sensíveis (Baker et al., 2005), assim como em isolados resistentes com mutações também no *katG* (Kelley et al., 1997; Rinder et al., 1998).

Mutações no gene *ndh* reduzem a atividade da NADH desidrogenase em *M. tuberculosis*, levando a um aumento na concentração de NADH, o que impediria a ligação da isoniazida à enzima InhA, causando resistência (Vilchèze and Jacobs Jr., 2014). No entanto, foram encontradas mutações no *ndh* tanto em isolados sensíveis como em isolados resistentes que também apresentaram mutações nos genes *katG* e *inhA* (Ramaswamy et al., 2003; Cardoso et al., 2007).

A regulação negativa da expressão do gene *katG* também parece estar associada à resistência à isoniazida. Mutações na região intergênica *furA-katG* foram identificadas em isolados resistentes, causando uma

diminuição da expressão do *katG* e conferindo resistência à isoniazida (Ando et al., 2011).

Bombas de efluxo são proteínas transmembrana envolvidas na expulsão ativa de compostos nocivos e metabólitos do interior da célula bacteriana para o ambiente externo. Estas estruturas estão associadas com o transporte de uma ampla gama de antimicrobianos estruturalmente não relacionados, impedindo-os de atingir seus alvos (Webber and Piddock, 2003).

Estudos recentes têm investigado mecanismos de efluxo e sua relação com a resistência à isoniazida em *M. tuberculosis*. Observou-se que substâncias inibidoras de efluxo foram capazes de diminuir a resistência à isoniazida em isolados que apresentavam atividade de efluxo aumentada. Esta atividade foi contida por inibidores de efluxo e os isolados apresentaram superexpressão dos seguintes genes que codificam bombas de efluxo: *efpA*, *mmpL7*, *mmr*, *p55* e *Rv1258c* (Rodrigues et al., 2012). Machado e col. (2012) demonstraram que isolados inicialmente sensíveis e isolados monorresistentes à rifampicina expostos a concentrações críticas de isoniazida passaram a desenvolver resistência a este fármaco. Na maioria desses isolados, foi possível reduzir a resistência à isoniazida pelo uso de inibidores de efluxo (Machado et al., 2012).

1.4.2. Rifampicina

A rifampicina, um derivado sintético da rifamicina, possui ação bactericida altamente efetiva contra *M. tuberculosis*, sendo um fármaco-chave na terapia anti-TB (Ramaswamy and Musser, 1998). Este fármaco é ativo tanto contra bacilos em multiplicação quanto contra bacilos com baixa atividade metabólica, possuindo, assim, uma alta atividade esterilizante *in vivo* (Zhang and Yew, 2009).

A rifampicina interfere na síntese do RNA bacteriano por se ligar à subunidade β da RNA polimerase, codificada pelo gene *rpoB*, impedindo o alongamento da cadeia de RNA. Em *M. tuberculosis*, mutações relacionadas

à resistência à rifampicina ocorrem em uma frequência de 10^{-7} a 10^{-8} bacilos. A grande maioria (96%) dessas mutações, que podem ser desde alterações em um único nucleotídeo até pequenas inserções e deleções, acontece em uma região de 81 pb do gene *rpoB*, chamada de região determinante de resistência à rifampicina (RRDR, do inglês *rifampicin-resistance determining region*), que compreende os códons 507-533 (Zhang and Yew, 2009). As mutações mais frequentes no *rpoB* ocorrem no códon 531, seguido pelos códons 526 e 516 (Ramaswamy and Musser, 1998).

Mutações no *rpoB* geralmente resultam em alto nível de resistência à rifampicina (CIM>32µg/mL), além de resistência cruzada a todas as rifamicinas. No entanto, mutações específicas nos códons 511, 516, 518 e 522 estão associadas a um baixo nível de resistência à rifampicina e rifapentina, mas sensibilidade à rifabutina e ao rifalazil (Zhang and Yew, 2009).

1.5. Detecção da resistência de *M. tuberculosis* aos fármacos

1.5.1. Métodos fenotípicos

Testes laboratoriais de sensibilidade de *M. tuberculosis* aos agentes anti-TB possuem três finalidades principais. Primeiramente, eles podem ser usados como orientação na escolha da quimioterapia a ser dada ao paciente. Em segundo lugar, eles permitem a confirmação de que houve desenvolvimento de resistência aos fármacos quando um paciente não mostra uma resposta satisfatória ao tratamento e, em terceiro lugar, podem ser usados para a vigilância da resistência aos medicamentos (WHO, 2018c).

Mitchison, em 1969, definiu a resistência de *M. tuberculosis* como uma diminuição na sensibilidade a um nível suficiente que se permita afirmar que o isolado em questão é diferente de isolados selvagens, os quais nunca foram expostos ao fármaco. Isolados que não podem crescer em concentrações críticas de um determinado medicamento são definidos como

sensíveis, enquanto aqueles que podem crescer nessas concentrações são considerados resistentes (Mitchison, 1969).

Canetti (1965) mostrou que mesmo em isolados sensíveis havia certa proporção de mutantes resistentes pré-existentes na população e calculou que uma proporção de 1% era o limite máximo entre isolados sensíveis e resistentes, criando o conceito de proporção crítica. A proporção crítica é definida, então, como a proporção de organismos resistentes dentro de um determinado isolado, utilizada para determinar a resistência a um medicamento. Uma proporção crítica de 1% é usada para diferenciar cepas sensíveis de resistentes. Qualquer cultura que mostre menos de 1% de crescimento em um meio contendo uma concentração crítica do agente a ser testado, quando comparada com o crescimento em um meio controle sem o agente, é considerada sensível; uma cultura que tem 1% ou mais de crescimento no meio contendo a concentração crítica do agente é considerada resistente e o paciente cujo isolado está sendo testado pode não responder à terapia com o antimicrobiano em questão. Sendo assim, os métodos fenotípicos utilizados atualmente para se testar a maioria dos agentes anti-TB de 1ª e 2ª linha se baseiam em concentrações e/ou proporções críticas (WHO, 2018c).

Atualmente, a resistência de *M. tuberculosis* é definida como uma redução significativa na sensibilidade a um medicamento específico, sendo improvável que os isolados resistentes demonstrem responsividade clínica ao fármaco (Migliori et al., 2018).

Os métodos fenotípicos baseados em cultura permanecem como referência para a detecção da resistência, mesmo sendo demorados e trabalhosos, além de demandarem infraestrutura laboratorial sofisticada. Quando realizados a partir do crescimento de *M. tuberculosis* em cultura, esses métodos são denominados indiretos; quando aplicados diretamente em amostras clínicas, são denominados diretos (Migliori et al., 2018).

Os principais métodos fenotípicos indiretos recomendados pela OMS para o teste de sensibilidade de *M. tuberculosis* podem ser realizados em meios líquidos ou em meios sólidos a base de ovos ou agar (WHO, 2018c).

Os ensaios em meios sólidos, como o método das proporções, da razão de resistência e da concentração absoluta, são relativamente baratos e utilizados mundialmente, mas foram padronizados principalmente para os fármacos de 1ª linha e podem demorar até oito semanas para fornecer resultados (Migliori et al., 2018).

Os métodos automatizados baseados em cultura líquida, como o BACTEC MGIT 960 (Becton & Dickinson, EUA), são mais rápidos, produzindo resultados em até duas semanas. Este sistema utiliza tubos com o meio líquido 7H9 que contém um composto fluorescente envolvido em silicone. O composto fluorescente é sensível à presença de oxigênio dissolvido no meio. A concentração inicial de oxigênio dissolvido atenua a emissão de fluorescência proveniente do composto. Subsequentemente, quando há o consumo de oxigênio por microrganismos presentes no meio, o composto desenvolve fluorescência e o crescimento bacteriano é detectado pelo instrumento (ECDC, 2018).

O método BACTEC MGIT 960 é recomendado como referência e foi validado para o teste de sensibilidade aos fármacos de 1ª e 2ª linha, além de novos fármacos como bedaquilina e delamanida (WHO, 2018c). Outra metodologia de teste de sensibilidade em meio líquido é a microdiluição em placa, que permite determinar concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para diversos fármacos em uma única placa, podendo ser realizada *in house* (Palomino et al., 2002; Gallo et al., 2017a) ou estando disponível comercialmente (Rancoita et al., 2018).

O sistema automatizado BACTEC MGIT 960 é uma das metodologias utilizadas na rotina diagnóstica do Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses (NTM) do Instituto Adolfo Lutz para a detecção da resistência de *M. tuberculosis* aos fármacos de 1ª e 2ª linha (Adami et al., 2017; Gallo et al., 2017a). Nesta técnica, concentrações críticas de cada fármaco são utilizadas para determinar se um isolado é resistente ou sensível ao medicamento testado, sendo que a concentração crítica é definida como a menor concentração de um fármaco que inibe o crescimento

de 99% de isolados fenotipicamente selvagens de *M. tuberculosis* (WHO, 2018c).

Uma vez que o tubo controle de crescimento contendo o inóculo bacteriano a 1% torna-se positivo, após um período de cinco a 13 dias, o instrumento irá compará-lo com o crescimento nos tubos contendo os fármacos. Os resultados são qualitativos: caso o tubo com o fármaco seja negativo quando o tubo controle é positivo, o isolado é considerado sensível; se o tubo com fármaco for positivo antes ou no mesmo dia em que o tubo controle se torna positivo, o isolado é considerado resistente (ECDC, 2018).

As concentrações críticas dos fármacos anti-TB utilizadas para a determinação da sensibilidade *in vitro* foram determinadas experimentalmente por meio da comparação entre o crescimento de isolados selvagens e não-selvagens, em vez de se basearem em valores de farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) (Canetti, 1965). Sendo assim, a concentração crítica dos fármacos acaba tendo pouca correlação com a concentração presente *in vivo* nos pacientes.

Quando concentrações críticas são utilizadas para determinar a sensibilidade de *M. tuberculosis in vitro*, diferentes níveis de resistência fenotípicos não são considerados, ou seja, independentemente de o isolado apresentar nível de resistência baixo, moderado ou alto, ele é considerado resistente ao fármaco em questão. No entanto, as implicações biológicas de um nível baixo ou alto de resistência são diferentes. Sendo assim, é necessário que as concentrações *in vivo* sejam consideradas, isto é, a resistência fenotípica determinada *in vitro* deveria estar relacionada com as concentrações que são atingidas *in vivo*. Esta correlação é denominada ponto de corte clínico (do inglês *clinical breakpoint*) (Böttger, 2011).

O ponto de corte clínico é a concentração ou concentrações de um medicamento que definem uma CIM acima da concentração crítica que separa o isolado que provavelmente responderá ao tratamento daquele que provavelmente não responderá ao tratamento. Esta concentração é determinada levando-se em consideração informações de desfecho clínico disponíveis, distribuições de CIMs, marcadores genéticos e dados de PK/PD

incluindo a dosagem do fármaco. Portanto, é possível aumentar a dosagem para contornar a resistência observada a uma dosagem menor até se atingir a dosagem máxima tolerada pelo paciente. O ponto de corte clínico pode ser utilizado, então, para guiar decisões clínicas individuais durante o tratamento de um paciente (WHO, 2018c).

Considerando que um isolado pode apresentar baixo, moderado ou alto nível de resistência *in vitro*, entende-se que um nível de resistência baixo pode não corresponder à resistência clínica, enquanto que um determinado fármaco para o qual um isolado apresenta alto nível de resistência não será efetivo clinicamente. Por sua vez, as implicações clínicas de níveis moderados de resistência são menos claras, sendo necessários mais estudos (Böttger, 2011).

1.5.2. Teste de sensibilidade quantitativo

Devido ao aumento da frequência de resistência aos fármacos anti-TB observado mundialmente, existe a necessidade de se determinar precisamente a sensibilidade de *M. tuberculosis* aos agentes de 1ª e 2ª linha. O tratamento dos pacientes com TB resistente deve ser baseado em medidas quantitativas e confiáveis de sensibilidade, prevenindo assim a amplificação da resistência e permitindo que os agentes antimicrobianos disponíveis sejam utilizados otimadamente (Cambau et al., 2015).

O sistema automatizado BACTEC MGIT 960 tem sido utilizado para testar diferentes concentrações de fármacos a fim de se determinar precisamente o nível de resistência de isolados de *M. tuberculosis* resistentes à concentração crítica (Springer et al., 2009; Cambau et al., 2015). Com isso, é possível implantar esquemas de tratamento personalizados principalmente para os pacientes com TB-MR ou XDR (Schön et al., 2017).

No teste de sensibilidade quantitativo pelo BACTEC MGIT 960, o princípio do método das proporções é mantido, isto é, o inóculo no tubo controle de crescimento sem fármaco corresponde a 1% do inóculo usado

nos tubos com os fármacos. Os resultados são interpretados como resistente a um nível baixo, intermediário ou alto do agente testado (Cambau et al., 2015).

1.5.3. Métodos moleculares baseados na detecção de alterações na sequência de ácidos nucleicos

Métodos clássicos para a detecção da resistência em *M. tuberculosis* se baseiam no isolamento em cultura seguido do teste de sensibilidade aos fármacos. Devido ao crescimento lento de *M. tuberculosis*, o advento de métodos moleculares tornou possível a diminuição do tempo para detecção da resistência, que fenotipicamente pode levar de duas a oito semanas, para apenas dois a três dias (Brossier et al., 2017).

Testes moleculares para o diagnóstico de resistência em *M. tuberculosis* são baseados na detecção de mutações que alteram genes ou a expressão de genes associados à resistência (Brossier et al., 2017). Esses métodos podem ser aplicados como complemento aos métodos clássicos, servindo como testes rápidos realizados diretamente a partir de amostras ou permitindo a identificação e detecção rápida da resistência em isolados em cultura. Devido a sua rapidez, os testes baseados em detecção de alterações na sequência de ácidos nucleicos em *M. tuberculosis* têm a vantagem de permitir que o tratamento do paciente seja iniciado de maneira mais rápida e com fármacos verdadeiramente efetivos (ECDC, 2018).

Entre os métodos moleculares comerciais para detecção da TB resistente recomendados pela OMS e utilizados no Brasil, estão o GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, EUA) e o GenoType MTBDR_{plus} e GenoType MTBDR_{sl} (Hain Lifescience, Alemanha). Métodos *in house* como o sequenciamento pelo método de Sanger e o sequenciamento de nova geração (do inglês *next generation sequencing*, NGS) estão sendo usados com frequência cada vez maior no diagnóstico da resistência em TB.

1.5.3.1. Xpert MTB/RIF e Xpert MTB/RIF Ultra

O Xpert MTB/RIF, chamado no Brasil de teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB), é um teste que identifica, diretamente em espécimes clínicos processados ou não processados, o CMT a partir de uma sequência de 81 pb do gene *rpoB*, além de verificar a resistência à rifampicina por meio das mutações encontradas nesta região-alvo (WHO, 2011).

A plataforma GeneXpert Dx integra e automatiza o processamento da amostra, a amplificação dos ácidos nucleicos e a detecção das sequências-alvo, fornecendo resultados em duas horas. O sistema é composto por um cartucho contendo todos os tampões e reagentes liofilizados necessários para a realização da reação de amplificação, um instrumento GeneXpert e um *software* específico que realiza a interpretação dos resultados (WHO, 2011).

O ensaio utiliza a tecnologia de *molecular beacons*, que são sondas de hibridação de ácidos nucleicos marcadas com diferentes fluoróforos, para detectar as sequências de DNA amplificadas por PCR em tempo real. São utilizadas cinco sondas com sequências complementares a cinco diferentes regiões do gene *rpoB* de um isolado de *M. tuberculosis* selvagem (ou seja, sensível à rifampicina). Estas sondas se sobrepõem e, juntas, analisam toda a região de 81 pb do *rpoB* (Lawn and Nicol, 2011).

O teste foi desenvolvido para ser aplicado em laboratórios de infraestrutura simples que realizam baciloscopia, nos quais não existe cabine de segurança biológica disponível. O reagente para tratamento da amostra contido no kit é micobactericida, inativando *M. tuberculosis* rapidamente durante o processo de liquefação da amostra (WHO, 2011).

A nova versão do Xpert MTB/RIF, denominada Xpert MTB/RIF Ultra, fornece uma detecção da resistência à rifampicina mais acurada. Quatro sondas do tipo *sloppy molecular beacons* foram desenvolvidas para detectar mutações na RRDR do gene *rpoB* pela análise de alterações nos picos de temperatura de *melting* (T_m), definida como a temperatura na qual metade da sonda está na forma desnaturada, ou seja, não pareada, e a outra metade está pareada com o DNA-alvo. Esta temperatura varia de acordo

com especificidade da ligação entre a sonda e a sequência-alvo: caso o DNA presente na amostra seja de um *M. tuberculosis* sensível, todos os nucleotídeos das sondas vão se ligar ao DNA-alvo; por outro lado, se houver alguma alteração na sequência do DNA presente na amostra, a sonda complementar à região onde houve a alteração não se ligará totalmente, resultando em um pico de T_m diferente do pico da sonda que se ligou completamente. Sendo assim, as T_m de cada sonda totalmente ligada à sequência de DNA de um *M. tuberculosis* sensível são conhecidas, assim como as T_m correspondentes aos diversos tipos de mutações (El-Hajj et al., 2009).

O ensaio permite que uma grande variedade de mutações seja identificada, além de diferenciar mutações sinônimas de outras que ocorrem na RRDR (Migliori et al., 2018). O novo cartucho também utiliza um volume maior da amostra na reação de amplificação, um programa de amplificação mais rápido e incluiu mais dois alvos para a detecção do CMT, as sequências de inserção IS6110 and IS1081, presentes em múltiplas cópias no genoma das espécies do complexo (ECDC, 2018).

O Xpert MTB/RIF está em uso no Brasil desde 2014 e a substituição deste teste pelo Ultra ocorreu no final de 2019.

1.5.3.2. GenoType MTBDRplus e GenoType MTBDRsl

Os *line probe assays* (LPAs) ou ensaios de sondas em linha são testes baseados em fitas de nitrocelulose que permitem a determinação do perfil de resistência de *M. tuberculosis* por meio da ligação do DNA amplificado da amostra às sondas cujos alvos são regiões contendo as mutações mais frequentes relacionadas à resistência aos fármacos de 1ª e 2ª linha e também regiões correspondentes a sequências selvagens, ou seja, sequências sem mutação. Esses ensaios podem ser aplicados diretamente em amostras clínicas com resultado de baciloscopia positiva ou em isolados clínicos (Migliori et al., 2018).

O GenoType MTBDR_{plus} versão 2.0 permite a identificação do CMT e a detecção da resistência à rifampicina e à isoniazida a partir de mutações nos genes *rpoB* e *katG/inhA*, respectivamente. O GenoType MTBDR_{s/} versão 1.0 também identifica o CMT e detecta simultaneamente a resistência às fluoroquinolonas pela análise de mutações no gene *gyrA*, aos aminoglicosídeos e peptídeos cíclicos (fármacos injetáveis como amicacina, canamicina e capreomicina) pela análise do gene *rrs* e ao etambutol pelo gene *embB*. A versão 2.0 do kit GenoType MTBDR_{s/} incluiu a análise de mutações no gene *gyrB* para aumentar a sensibilidade na detecção da resistência às fluoroquinolonas e substituiu o gene *embB* pela região promotora do gene *eis*, relacionada à resistência à canamicina (ECDC, 2018; Migliori et al., 2018).

Os procedimentos de realização de ambos os testes são idênticos e divididos nas seguintes etapas: extração do DNA da amostra, amplificação do DNA por PCR multiplex com iniciadores biotinilados, hibridação reversa do produto da PCR com as fitas e revelação da hibridação por reação com fosfatase alcalina (Hain Lifescience GmbH, 2012). Devido ao nível de dificuldade moderado deste ensaio, à necessidade de equipamentos para a realização das suas etapas e aos requerimentos de infraestrutura laboratorial, os LPAs devem ser implantados em laboratórios de média a alta complexidade. Comparado com o teste de sensibilidade fenotípico, o LPA fornece resultados mais rápidos, além de apresentar menor risco de biossegurança e maior rendimento (Migliori et al., 2018).

As membranas de nitrocelulose presentes no kit são revestidas com sondas específicas complementares a sequências dos genes investigados pelo ensaio. Após a extração do DNA, este será amplificado e o produto da PCR estará marcado com biotina. Este produto é então desnaturado quimicamente para que esteja em fita única e possa se ligar às sondas presentes na membrana (hibridação). A fosfatase alcalina conjugada à estreptavidina se liga à biotina presente no produto amplificado e transforma o substrato adicionado em um corante que se torna visível na membrana como um precipitado colorido. Os padrões de banda formados são então

interpretados visualmente ou por meio do *software* GenoScan (Hain Lifescience, Alemanha) (Hain Lifescience GmbH, 2012). Os testes GenoType MTBDR*plus* e *sl*, ambos da versão 2.0, foram recomendados pela OMS em 2016 para a detecção rápida da TB-MR e TB-XDR, respectivamente, e estão implantados na rotina do NTM desde fevereiro de 2019.

1.5.3.3. Sequenciamento genômico baseado em PCR

O sequenciamento do DNA de *M. tuberculosis* pode ser utilizado como complemento aos ensaios fenotípicos e moleculares de detecção de resistência. Por meio do sequenciamento é possível detectar novas mutações, assim como confirmar a presença das mutações mais prevalentes associadas à resistência, oferecendo muitos benefícios ao manejo clínico do paciente (Kourout et al., 2009; Choi et al., 2010; Chikaonda et al., 2017). A técnica de sequenciamento detecta mutações por meio da comparação das diferenças na sequência de ácidos nucleicos entre a cepa de referência selvagem *M. tuberculosis* H37Rv e o isolado analisado (Si et al., 2012).

Técnicas de sequenciamento de NGS permitem o sequenciamento do genoma completo (do inglês *whole genome sequencing*, WGS) ou de diversas regiões de interesse (sequenciamento direcionado, do inglês *targeted next generation sequencing*, T-NGS) presentes no genoma do microrganismo. A partir da sequência obtida, pode-se realizar a identificação da espécie, a triagem de todos os tipos de mutação (conhecidos ou não), a detecção da resistência aos fármacos e a análise filogenética do microrganismo (Nguyen et al., 2019).

Alguns kits comerciais que usam o sequenciamento direcionado para a identificação da espécie e detecção de mutações associadas à resistência em *M. tuberculosis* estão disponíveis no mercado. Esses métodos se baseiam na extração do DNA diretamente de amostras clínicas, amplificação e sequenciamento a partir dos produtos gerados na amplificação. Um protocolo desenvolvido pela Life Technologies (EUA) utilizando o instrumento Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) e o

AmpliSeq da Illumina (EUA) permitem a amplificação e o sequenciamento na íntegra de até oito genes (*rpoB*, *katG*, *inhA*, *pncA*, *gyrA*, *eis*, *embB* e *rpsL*) para detecção da resistência aos fármacos de 1ª e 2ª linha em apenas dois dias (Daum et al., 2012; Migliori et al., 2018; Nguyen et al., 2019). Outro kit disponível é o Deeplex-MycTB (GenoScreen, França), que analisa genes responsáveis pela resistência a 13 fármacos diferentes, além de realizar a genotipagem e identificação da espécie diretamente a partir de amostras clínicas. O sistema ainda oferece acesso a um aplicativo localizado na nuvem que analisa e interpreta os dados do sequenciamento (Tagliani et al., 2017).

Devido à necessidade de grandes quantidades de DNA com um alto nível de qualidade para a realização do sequenciamento do genoma completo, esta metodologia pode ser realizada somente a partir de isolados em cultura (Nguyen et al., 2019). O sequenciamento do genoma completo, independentemente da plataforma utilizada, possui quatro etapas principais: extração de DNA, preparação da biblioteca (composta pela fragmentação do DNA e sua ligação aos adaptadores), sequenciamento de nova geração gerando milhões de fragmentos e análise de dados (Migliori et al., 2018).

As plataformas disponíveis, como Illumina, Ion Torrent (Thermo Fischer, EUA), Pacific Biosciences (EUA) e MinION (Oxford Nanopore, Reino Unido) variam em termos de tamanho dos fragmentos gerados, taxa de erro, custo e outros parâmetros (Kwong et al., 2015). A análise de dados de resistência aos fármacos envolve a identificação de polimorfismos nos genes associados à resistência utilizando-se ferramentas gratuitas disponíveis *online* (como, por exemplo, TBProfiler, PhyReSE, Mykrobe, etc), assim como *softwares* pagos. As ferramentas *online*, apesar de gratuitas, necessitam de curadoria contínua e validação no laboratório para serem aplicadas na rotina diagnóstica (Migliori et al., 2018). Mesmo assim, as grandes vantagens do sequenciamento do genoma completo são a disponibilização de uma alta cobertura do genoma e de informações epidemiológicas, além da elucidação de novos mecanismos de resistência

para fármacos clássicos e mais recentes, trazendo informações valiosas para o campo da pesquisa e para o tratamento da TB (Nguyen et al., 2019).

1.6. Epidemiologia molecular

A epidemiologia molecular é um campo multidisciplinar que integra biologia molecular, medicina clínica, estatística e epidemiologia, tendo como objetivo principal identificar os fatores que determinam a causalidade, propagação, disseminação e distribuição das doenças infecciosas no tempo e no espaço (Mathema et al., 2006). Atualmente, métodos de genotipagem de *M. tuberculosis* auxiliam na investigação de contatos, nos estudos de rotas de transmissão, na detecção precoce de surtos, na identificação de grupos de alto risco para transmissão, na investigação de contaminação cruzada em laboratório e na distinção entre reinfecção e reativação. Além disso, a epidemiologia molecular tem papel bastante importante no estudo da estrutura populacional das famílias do CMT e sua dinâmica de transmissão (Barnes and Cave, 2003).

Durante muitos anos, a abordagem padrão para genotipagem de isolados de *M. tuberculosis* foi a análise por RFLP (do inglês *restriction-fragment-length polymorphism*) da distribuição da sequência de inserção IS6110 em diferentes isolados (Barnes and Cave, 2003). Sequências de inserção são elementos genéticos móveis de pequeno tamanho (< 2,5 kb) que se encontram amplamente e aleatoriamente distribuídos no genoma de *M. tuberculosis* (Mathema et al., 2006).

Isolados de *M. tuberculosis* podem apresentar números de cópias de IS6110 variando de nenhum (em raros casos) a até 26 cópias (van Soolingen et al., 1991; Kanduma et al., 2003). Isolados não relacionados possuem diferentes perfis de RFLP, enquanto que pacientes infectados por isolados epidemiologicamente relacionados geralmente apresentam perfis de RFLP idênticos (Barnes and Cave, 2003). O RFLP não consegue classificar isolados com menos de seis cópias da IS6110 em seu genoma; além disso, necessita de DNA purificado a partir de uma grande quantidade

de crescimento em cultura e é composto por etapas trabalhosas e demoradas (Barnes and Cave, 2003; Mathema et al., 2006).

Por ser um método bastante trabalhoso, o RFLP tem sido substituído pela técnica de MIRU-VNTR (do inglês *mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats*), na qual a tipagem de *M. tuberculosis* é baseada no número variável de repetições adjacentes de unidades repetitivas intercaladas presentes no genoma. Esta metodologia se baseia em PCR convencional e detecta, por meio da verificação do tamanho dos produtos amplificados, o número das repetições de 12, 15 ou 24 *loci* específicos (Supply et al., 2001). A vantagem do MIRU-VNTR sobre o RFLP é a maior facilidade de sua execução, análise e maior rapidez. Além disso, os resultados podem ser comparados com os de outros laboratórios do mundo por meio de uma base de dados contendo os diferentes perfis encontrados (Barnes and Cave, 2003).

Outra metodologia bastante utilizada na tipagem molecular de *M. tuberculosis* é o *spoligotyping* ou *spacer oligonucleotide typing*, baseado no polimorfismo de DNA presente em uma região cromossômica denominada *locus DR* (do inglês *direct repeat*). O *locus DR* contém de 10 a 50 cópias de uma repetição direta de 36 pb, a qual é separada de outra repetição por 43 espaçadores com sequências diferentes. Como os isolados diferem quanto à presença ou ausência de espaçadores específicos, o padrão de espaçadores em um isolado pode ser usado para a genotipagem (Barnes and Cave, 2003). Quando comparado ao RFLP, o *spoligotyping* pode ser realizado diretamente de amostras clínicas, por não necessitar de grandes quantidades de DNA, e os resultados obtidos, representados por positivo ou negativo para cada espaçador, podem ser expressos em formato digital, permitindo a comparação com resultados de outros locais. De acordo com os perfis obtidos, os isolados podem ser categorizados como pertencentes a diferentes famílias, as quais se distribuem em regiões geográficas e em populações específicas. No entanto, o poder discriminatório deste método é inferior ao do RFLP e do MIRU-VNTR (Kremer et al., 1999).

O sequenciamento do genoma completo também tem sido aplicado em investigações epidemiológicas em TB, especialmente na identificação de surtos e para traçar rotas de transmissão. Por gerar informações sobre a sequência completa de DNA de *M. tuberculosis*, este método é muito mais acurado do que os métodos clássicos de tipagem na detecção da variabilidade entre isolados, produzindo resultados que podem ser aplicados em nível global (população), local (comunidade), individual (paciente) e até ao próprio patógeno (Jagielski et al., 2015).

1.7. Esquemas de tratamento para TB

Para ser efetivo, o esquema anti-TB deve contar com fármacos que possuam atividade bactericida precoce, que sejam capazes de prevenir a emergência de bacilos resistentes e que tenham atividade esterilizante (Ministério da Saúde, 2019).

No Brasil, os esquemas de tratamento para TB são padronizados e compreendem duas fases: a intensiva e a de manutenção. A primeira fase conta com medicamentos de alto poder bactericida, visando reduzir rapidamente a população bacilar e eliminar os bacilos com resistência natural a algum medicamento, diminuindo a contagiosidade do paciente. Na fase de manutenção são utilizados agentes com maior poder bactericida e esterilizante, que atuam, portanto, em todas as populações bacilares, com o objetivo de eliminar os bacilos latentes ou persistentes, diminuindo a possibilidade de recidiva da doença (Ministério da Saúde, 2019).

Até o ano de 2009, o tratamento para os casos novos de TB pulmonar e extrapulmonar era denominado Esquema I e utilizava isoniazida, rifampicina e pirazinamida na fase intensiva com duração de dois meses, e rifampicina e isoniazida na fase de manutenção com duração de quatro meses (Ministério da Saúde, 2002). Devido ao aumento da resistência primária à isoniazida de 4,4% a 6% detectado após o II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos Anti-TB realizado em 2007-2008, em 2009 o etambutol foi introduzido na fase intensiva do tratamento, o qual passou a

ser denominado esquema básico (Ministério da Saúde, 2009). O esquema básico permanece sendo utilizado até os dias de hoje no país para o tratamento da TB em adultos e adolescentes. Este esquema é indicado para casos novos e de retratamento por recidiva após cura ou reingresso devido ao abandono em adultos e adolescentes, exceto para os casos de forma meningoencefálica e osteoarticular (Ministério da Saúde, 2019).

O tratamento da TB resistente, por sua vez, requer o uso de fármacos de 2ª linha, que são menos efetivos, resultando em uma duração maior do tratamento e que apresentam maior potencial de toxicidade, o que acarreta em um tratamento de pior prognóstico (Caminero, 2016). O esquema para TB resistente deve conter pelo menos quatro fármacos efetivos, pelo menos dois fármacos essenciais (com capacidade bactericida e esterilizante), e mais um ou dois fármacos acompanhantes, ou seja, que apresentem ação protetora aos essenciais contra o desenvolvimento de resistência (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação dos fármacos anti-tuberculose

| | |
|--|---|
| GRUPO 1 Fármacos de 1ª linha (orais) | Essenciais Isoniazida, rifampicina e pirazinamida |
| | Acompanhante Etambutol |
| GRUPO 2 Fluoroquinolonas | Essenciais Levofloxacino (altas doses) e moxifloxacino |
| GRUPO 3 Injetáveis | Essenciais Estreptomina, canamicina, amicacina e capreomicina |
| GRUPO 4 Fármacos de 2ª linha menos eficazes | Acompanhantes Etionamida/protionamida, cicloserina/terizidona e PAS (ácido paraminossalicílico) |
| GRUPO 5 Fármacos de 2ª linha com menor experiência clínica | Essenciais Linezolida, bedaquilina, delamanid |
| | Acompanhantes Clofazimina, carbapenem, amoxicilina/clavulanato de potássio |

Fonte: Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, 2019.

1.7.1. Monorresistência à isoniazida

De acordo com as recomendações do Ministério da Saúde publicadas em 2009 e vigentes até 2018, os casos de monorresistência à isoniazida cuja resistência houvesse sido descoberta ainda durante a fase intensiva do tratamento, deviam ser tratados com o esquema 2RZES/4RE (dois meses de rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomicina, e quatro meses de rifampicina e etambutol). Caso a resistência fosse detectada durante a fase de manutenção, o tratamento com o esquema básico poderia ser prorrogado para até sete meses (Ministério da Saúde, 2009; Ministério da Saúde, 2011).

Segundo a recomendação vigente do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2019) atualmente, o tratamento da monorresistência à isoniazida deve considerar o momento em que a resistência foi diagnosticada, a evolução do paciente até o momento do diagnóstico da resistência e a presença de resistência concomitante à rifampicina. No quadro abaixo seguem os esquemas de tratamento preconizados em cada situação específica (Quadro 2).

Quadro 2. Esquemas de tratamento recomendados para tuberculose monorresistente à isoniazida

| MOMENTO DO DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA À H | EVOLUÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E RADIOLÓGICA | CONDUTA OU ESQUEMA RECOMENDADO | OBSERVAÇÃO |
|--|--|--|--|
| Antes do início do tratamento com esquema básico (EB) ou nos primeiros 30 dias do EB | Não se aplica | 2 R Lfx Z E / 7 R Lfx E ou | Esquema preferencial. |
| | | 9RHZE Lfx (WHO 2018) | Esquema indicado quando, previamente ao tratamento, for identificada dificuldade de adesão ao esquema com maior número de comprimidos. |
| Fase intensiva do EB | Favorável ¹ | 9 R H Z E | No momento do diagnóstico de monorresistência, solicitar TRM-TB e nova cultura com TS. Se TRM-TB resultar em resistência à R – iniciar esquema para TB MDR. Reavaliar o esquema de tratamento após o resultado do novo TS. |
| | Desfavorável ² | Solicitar TRM-TB. Se TRM-TB resultar em sensível à R, manter RHZE por mais um mês e reavaliar. | Se evoluir bem, manter RHZE até completar 9 meses de tratamento. |
| | | Se TRM-TB resultar em resistência à R – iniciar esquema para TB MDR. | Se evoluir desfavoravelmente: iniciar esquema TB MDR. |
| Fase de manutenção do EB | Favorável ¹ | R H (até completar 9 meses de tratamento) ^{3, 4} | Solicitar TRM-TB e nova cultura com TS. Se TRM-TB resultar em resistência à R – iniciar esquema para TB MDR. Reavaliar o esquema de tratamento após o resultado do novo TS. |
| | Desfavorável ² | Iniciar esquema para TB MDR | |

Fonte: CGPNCT/SVS/MS.

R – Rifampicina; Lfx – Levofloxacino; Z – Pirazinamida; E – Etambutol; H – Isoniazida

¹Evolução favorável – quando o paciente apresenta melhora clínica, associada à negatificação da baciloscopia e à melhora do aspecto radiológico, com adesão ao tratamento.

²Evolução desfavorável – quando o paciente não apresenta melhora clínica, além disso mantém baciloscopia positiva e/ou aspecto radiológico evidenciando atividade de doença.

³Considerando-se que a evolução é favorável, a população bacilar presente dentro da cavidade pulmonar, a mais suscetível de apresentar mutantes resistentes, reduziu drasticamente ou foi extinta. Nessas situações a rifampicina sozinha conseguirá eliminar os bacilos persistentes, requerendo, no entanto, um tempo maior de atuação para reduzir a possibilidade de recidiva.

⁴Quando desconhecido o tipo de mutação determinante da resistência, considerar o uso de altas doses de H (15 a 20 mg/Kg/dia)

Os números antes das letras correspondentes a cada medicamento se referem à quantidade de meses de tratamento. EB: esquema básico.

Adaptado de Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, 2019.

1.7.2. Polirresistência

A definição do melhor esquema de tratamento para as polirresistências deve se basear no padrão de resistência, na evolução clínica, no histórico de tratamento e no uso racional de medicamentos (Ministério da Saúde, 2019).

Os esquemas de tratamento para TB polirresistente recomendados até o ano de 2018 estão descritos no Quadro 3 (Ministério da Saúde, 2011).

Quadro 3. Esquemas de tratamento para tuberculose polirresistente, 2011

| Tipo de polirresistência | Esquema |
|---------------------------------|-----------------------------|
| H+Z | 2R E S O(Lfx) / 7R E O(Lfx) |
| H+E | 2R Z S O(Lfx) / 7R O(Lfx) |
| R+Z | 3H E S O(Lfx) / 9H E O(Lfx) |
| R+E | 3H Z S O(Lfx) / 12H O(Lfx) |
| H+Z+E | 3R S O(Lfx) / 12R O Trd |

H – isoniazida, Z – pirazinamida, R – rifampicina, E – etambutol, S – estreptomicina, O – ofloxacina, Lfx – levofloxacina, Trd – terizidona

Os números antes das letras correspondentes a cada medicamento se referem à quantidade de meses de tratamento.

Adaptado de Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, 2011.

O Quadro 4 mostra os esquemas de tratamento de casos de polirresistência vigentes atualmente (Ministério da Saúde, 2019).

Quadro 4. Esquemas de tratamento para tuberculose polirresistente, 2019

| Tipo de polirresistência | Esquema |
|---|---|
| H+S | Tratar como monorresistente à H |
| H+E (sensível ou resistente à S) | 2R Lfx Z Cm ₅ / 7R Lfx* |
| H+E+Z (sensível ou resistente à S) | 2R Lfx Z Cm ₅ Trd / 10R Lfx Trd* |
| H+Z (sensível ou resistente à S) | 2R Lfx Cm ₅ E / 7R Lfx E* |
| R+E e/ou Z (sensível ou resistente à S) | Tratar como MR + H |

H – isoniazida, S – estreptomicina, E – etambutol, R – rifampicina, Lfx – levofloxacina, Z – pirazinamida, Cm – capreomicina, Trd – terizidona, MR - multirresistência

*Os números que antecedem as letras indicam o tempo do tratamento em meses e o número subscrito, a quantidade de dias da semana. Quando não há descrição, consideram-se os sete dias da semana.

Adaptado de Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, 2019.

1.7.3. Multirresistência

O esquema de tratamento para TB-MR em vigência no período de 2009 a 2018 era (Ministério da Saúde, 2009; Ministério da Saúde, 2011):

2S₅ E Lfx Z Trd / 4S₃ E Lfx Z Trd / 12E Lfx Trd

S – estreptomicina, E – etambutol, Lfx – levofloxacina, Z – pirazinamida, Trd - terizidona

Atualmente, utiliza-se a classificação da OMS dos medicamentos que devem ser utilizados nos esquemas longos, os quais apresentam duração de no mínimo 18 meses, para o tratamento da TB-RR, TB-MR e TB-XDR (Quadro 5).

Quadro 5. Medicamentos recomendados para o tratamento da tuberculose resistente à rifampicina, multirresistente e extensivamente resistente

| Medicamentos | Grupo |
|--|--------------------------------|
| Levofloxacina Moxifloxacina Gatifloxacina (indisponível no SUS) | A Fluoroquinolonas |
| Amicacina Capreomicina Canamicina (indisponível no Brasil) Estreptomicina* | B Injetáveis de 2ª linha |
| Etionamida Protionamida (indisponível no Brasil) Terizidona Cicloserina (indisponível no Brasil) Linezolina Clofazimina | C Outros grupos de 2ª linha |
| Pirazinamida Etambutol D1 Isoniazida em altas doses | D Fármacos adicionais |
| Bedaquilina (indisponível no Brasil) Delamanid (indisponível no Brasil) D2 | |
| Ácido para-aminossalicílico (PAS) Imipenem-cilastatina (disponível localmente) Meropenem (disponível localmente) D3 Amoxicilina + clavulanato de potássio (disponível localmente) | |

* A estreptomicina é um agente de 1ª linha e sua utilização no tratamento de TB-MR está condicionada aos pacientes que nunca a utilizaram e cuja sensibilidade do *M. tuberculosis* seja comprovada.

Adaptado de Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, 2019.

O esquema de tratamento para TB-MR deve incluir:

- Pelo menos quatro fármacos novos, ou seja, não usados anteriormente para tratar o paciente;
- Uma fluoroquinolona (Grupo A);
- Um injetável (Grupo B);
- Dois fármacos acompanhantes (Grupo C);
- Pirazinamida (Grupo D1);
- Etambutol (Grupo D1).

Os medicamentos dos grupos D2 e D3 devem ser utilizados caso não seja possível compor um esquema com pelo menos quatro fármacos novos dentre os relacionados acima (WHO, 2016a; WHO, 2017; Ministério da Saúde, 2019).

Os esquemas padronizados atualmente para TB-MR, de acordo com o perfil de resistência no teste de sensibilidade, são (Quadro 6) (Ministério da Saúde, 2019):

Quadro 6. Esquemas de tratamento para tuberculose multirresistente

| Perfil de resistência | Esquema |
|--|---|
| H + R | 8 Cm ₃ Lfx Trd E Z / 10 Lfx Trd E* |
| H + R + E (sensível ou resistente a Z) | 8 Cm ₃ Lfx Trd Et Z / 10 Lfx Trd Et* |

H – isoniazida, R – rifampicina, Cm – capreomicina, Lfx – levofloxacina, Trd – terizidona, E – etambutol, Z – pirazinamida, Et – etionamida (o uso da etionamida deve ser considerado caso o isolado não possua mutação no gene *inhA*)

*Os números que antecedem as letras indicam o tempo do tratamento em meses e o número subscrito, a quantidade de dias da semana. Quando não há descrição, consideram-se os sete dias da semana.

Adaptado de Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, 2019.

Atualmente, a OMS recomenda um novo regime para TB-MR utilizando a classificação dos fármacos mostrada no Quadro 7 (WHO, 2019). O esquema padrão a ser utilizado é de seis meses de bedaquilina, linezolida, levofloxacina e terizidona seguidos por 12 meses de linezolida, levofloxacina e terizidona.

Quadro 7. Grupos de medicamentos recomendados pela Organização Mundial da Saúde para utilização nos esquemas de tratamento para tuberculose multirresistente

| Grupo | Medicamentos |
|---|---|
| Grupo A Incluir os três fármacos | Levofloxacina ou moxifloxacina Bedaquilina Linezolida |
| Grupo B Adicionar um ou ambos os fármacos | Clofazimina Cicloserina ou terizidona |
| Grupo C Adicionar para completar o esquema e quando os fármacos dos Grupos A e B não puderem ser utilizados | Etambutol Delamanid Pirazinamida Imipenem-cilastatina ou meropenem Amicacina ou estreptomicina Etionamida ou protionamida Ácido para-aminossalicílico |

Adaptado de WHO. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva, 2019.

1.7.4. TB extensivamente resistente

O esquema de tratamento para TB-XDR deve se basear no histórico de tratamento e no padrão de resistência apresentado no teste de sensibilidade. Os pacientes que apresentaram falência ao primeiro esquema de TB-MR devem ser tratados para TB-XDR mesmo sem comprovação da resistência pelo teste de sensibilidade, pois apresentam falência aos fármacos usados para TB-MR (Ministério da Saúde, 2019).

O esquema vigente recomendado para TB-XDR ou falência ao tratamento de TB-MR é (Quadro 8) (Ministério da Saúde, 2019):

Quadro 8. Esquema de tratamento para tuberculose extensivamente resistente

| Esquema ao qual o paciente apresentou falência | Esquema recomendado |
|---|--|
| 8 Cm ₃ Lfx Trd E Z / 10 Lfx Trd E* | 8 Am ₃ Mfx Lzd Cfz PAS H ^a / 4 Mfx Lzd Cfz PAS H ^a / 6 Mfx Lzd Cfz PAS H ^a |
| 8 Cm ₃ Lfx Trd Et Z / 10 Lfx Trd Et* | |

Cm – capreomicina, Lfx – levofloxacina, Trd – terizidona, E – etambutol, Z – pirazinamida, Et – etionamida (o uso da etionamida deve ser considerado caso o isolado não possua mutação no gene *inhA*), Am – amicacina, Mfx – moxifloxacina, Lzd – linezolida, Cfz – clofazimina, PAS – ácido para-aminossalicílico, H^a – isoniazida em altas doses

*Os números que antecedem as letras indicam o tempo do tratamento em meses e o número subscrito, a quantidade de dias da semana. Quando não há descrição, consideram-se os sete dias da semana.

Adaptado de Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, 2019.

1.7.5. Esquemas de tratamento individualizados

Em situações de toxicidade, alergia, intolerância e comorbidades, devem ser elaborados esquemas individualizados para pacientes que estão em tratamento de TB resistente. Para isso, devem ser seguidas as seguintes recomendações (Ministério da Saúde, 2019):

- O esquema deve ser composto por no mínimo cinco medicamentos, sendo que quatro devem ser dos grupos A ao C, e que preferencialmente não tenham sido utilizados anteriormente;
- Na impossibilidade de completar cinco medicamentos com os grupos A ao C, incluir o grupo D3;
- Considerar o uso da isoniazida em altas doses como medicamento adicional em pacientes com baixa resistência a ela (mutação no gene *inhA*).

2. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA DO PROJETO

O NTM é o laboratório de referência estadual para o diagnóstico da TB. Atualmente, a rede de laboratórios de tuberculose do estado de São Paulo é composta por 291 laboratórios, sendo que 80 realizam cultura e 41 realizam o TRM-TB. Desta maneira, o NTM recebe isolados de micobactérias de todo o estado para a realização de identificação da espécie e teste de sensibilidade aos fármacos utilizados no tratamento da TB.

Entre 2009 e 2011, foi desenvolvido no NTM e no Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, o projeto de mestrado de Maria Gisele Gonçalves, intitulado “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”, pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Neste projeto, 988 isolados de *M. tuberculosis* recebidos entre outubro de 2008 e março de 2009 foram submetidos prospectivamente à identificação e teste de sensibilidade aos fármacos de 1ª linha pelo método automatizado BACTEC MGIT 960, além de PCR em tempo real *in house* para a detecção de mutações nos genes relacionados à resistência à rifampicina e isoniazida.

Os isolados fenotipicamente resistentes à isoniazida (em conjunto ou não com outros fármacos) estudados no projeto de Maria Gisele Gonçalves foram selecionados para este estudo, a fim de se determinar o nível de resistência fenotípica à isoniazida e correlacioná-lo com as mutações encontradas por PCR em tempo real à época da realização do projeto. Ademais, a inclusão destes isolados recebidos pelo NTM em 2008-2009 possibilita a análise do desfecho de tratamento desses pacientes devido ao longo período de tratamento da TB resistente, que pode levar muitos anos, especialmente se não houver aderência ao tratamento.

Com o objetivo de se obter informações mais atuais sobre o perfil de resistência fenotípico e genotípico dos isolados de *M. tuberculosis* do estado de São Paulo, também foram incluídos no presente estudo isolados

recebidos pelo NTM de janeiro a dezembro de 2016. A investigação dos níveis fenotípicos de resistência à isoniazida e das mutações associadas tanto nos isolados de 2008-2009 como nos isolados de 2016 pode fornecer dados epidemiológicos sobre a evolução da resistência a este fármaco ao longo do tempo. Além disso, informações sobre mutações em isolados resistentes à isoniazida são de suma importância para o estabelecimento de esquemas de tratamento que utilizam a isoniazida em altas doses, como é recomendado pela OMS atualmente (Falzon et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar as mutações nos genes *katG*, *inhA* e *rpoB*, e os níveis fenotípicos de resistência à isoniazida em isolados de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes com TB resistente do estado de São Paulo, no período de outubro de 2008 a março de 2009 e no ano de 2016.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar o nível de resistência dos isolados à isoniazida pelo método automatizado BACTEC MGIT 960;
- Detectar as mutações mais frequentes nos genes relacionados à resistência à isoniazida (*katG* e *inhA*) e rifampicina (*rpoB*) dos isolados testados fenotipicamente, pelo kit comercial GenoType MTBDR_{plus};
- Analisar comparativamente os níveis de resistência fenotípica à isoniazida e as mutações encontradas nos genes *katG* e *inhA*;
- Analisar comparativamente os resultados do teste de sensibilidade fenotípico à rifampicina e as mutações encontradas no gene *rpoB*;
- Sequenciar os genes *katG*, *inhA* e *rpoB* nos casos discordantes entre a metodologia fenotípica e a molecular;
- Avaliar a evolução do nível de resistência à isoniazida e das mutações nos genes *katG*, *inhA* e *rpoB* de outros isolados resistentes pelo menos à isoniazida dos pacientes incluídos no estudo, recebidos pelo NTM antes de 2016 e durante o ano de 2017;
- Verificar a associação entre as mutações identificadas com o potencial de transmissão por meio da tipagem molecular dos isolados;
- Analisar o desfecho do tratamento dos pacientes incluídos no estudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Conselho Técnico Científico (CTC) do IAL sob o número de cadastro 12H/2015 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IAL sob o parecer de nº 1.473.145 (Anexo 1). Foram obedecidas todas as recomendações da Resolução nº 466 de 12/12/2012 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas científicas envolvendo seres humanos.

4.1. Isolados de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida

Todos os isolados de *M. tuberculosis* incluídos no estudo foram encaminhados ao NTM pelos laboratórios da rede de TB do estado de São Paulo que realizam cultura, como parte da rotina diagnóstica para a realização de identificação e teste de sensibilidade. Segundo as recomendações dos Programas Nacional e Estadual de Controle da Tuberculose, o teste de sensibilidade foi realizado somente se o paciente estivesse de acordo com um dos seguintes critérios (Ministério da Saúde, 2011):

- Ser contato de caso de TB resistente;
- Ter histórico de tratamento prévio;
- Ser portador de HIV;
- Possuir resultado de baciloscopia positiva no final do 2º mês de tratamento;
- Fazer parte de populações com maior risco de apresentar TB (profissionais de saúde, população em situação de rua, privados de liberdade, pacientes internados e indígenas).

Foram incluídos 374 isolados no estudo, os quais apresentaram crescimento na concentração de 0,1 µg/mL de isoniazida pelo método automatizado BACTEC MGIT 960, e foram resistentes ou não aos outros fármacos de 1ª linha (Adami et al., 2017). Estes isolados foram recebidos no NTM em dois períodos distintos:

- Período 1: 103 isolados de *M. tuberculosis* resistentes somente à isoniazida ou à isoniazida mais outros fármacos de 1ª linha recebidos entre outubro/2008 e março/2009 que foram objeto da dissertação de mestrado de Maria Gisele Gonçalves. Na ocasião do estudo, 988 isolados foram submetidos à identificação e teste de sensibilidade por BACTEC MGIT 960 aos fármacos de 1ª linha (estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol) (Ministério da Saúde, 2008). A pirazinamida foi testada pelo teste da pirazinamidase (Shikama et al., 2002). Neste período, o teste de sensibilidade para fármacos de 2ª linha (amicacina, canamicina, capreomicina e ofloxacina) era realizado pela técnica de microdiluição em caldo somente para alguns casos de TB-MR e sob pedido médico (Gallo et al., 2017a). No projeto de mestrado de Maria Gisele Gonçalves, os isolados também foram testados por PCR em tempo real *in house* tendo como alvos regiões específicas dos genes *katG*, *inhA* e *rpoB*. Para o gene *rpoB*, o alvo foi a RRDR de 81 pb (códon 507 a 533), enquanto que para o gene *katG*, a região analisada compreendeu dos códon 313 ao 318 e para o *inhA*, o alvo foram as posições -15 e -16 da região promotora. As sondas utilizadas no ensaio foram desenhadas para detectar somente sequências selvagens (ou seja, sem mutação). Uma vez reconhecida a sequência-alvo selvagem, havia ligação da sonda, emitindo fluorescência; caso houvesse qualquer tipo de mutação na região-alvo, a sonda não se ligava e, portanto, não emitia nenhum sinal fluorescente. Desta maneira, o ensaio detectava somente que a sequência do isolado analisado não era do tipo selvagem, não informando o tipo de mutação encontrado. Sendo assim, para se identificar o tipo de mutação apresentado, todos os isolados supostamente resistentes à isoniazida e/ou rifampicina foram submetidos ao sequenciamento pelo método de Sanger das mesmas regiões-alvo da técnica de PCR em tempo real (Gonçalves et al., 2012).

- Período 2: 216 isolados recebidos de janeiro a dezembro de 2016 que foram testados de rotina frente à isoniazida e rifampicina pelo BACTEC MGIT 960 (Adami et al., 2017). Caso fosse detectada resistência a um ou ambos os fármacos, os isolados foram testados frente à

estreptomicina, etambutol, pirazinamida, amicacina, canamicina, capreomicina, ofloxacina e/ou levofloxacina também pelo BACTEC MGIT 960 (Gallo et al., 2017a). A fim de se verificar a evolução da resistência fenotípica e molecular nos isolados de cada paciente, foram estudados também outros 55 isolados de *M. tuberculosis* correspondentes aos pacientes incluídos em 2016, recebidos em anos anteriores a 2016 e de janeiro a dezembro de 2017.

No total, os 374 isolados de *M. tuberculosis* analisados neste estudo foram correspondentes a 303 pacientes (Figura 2).

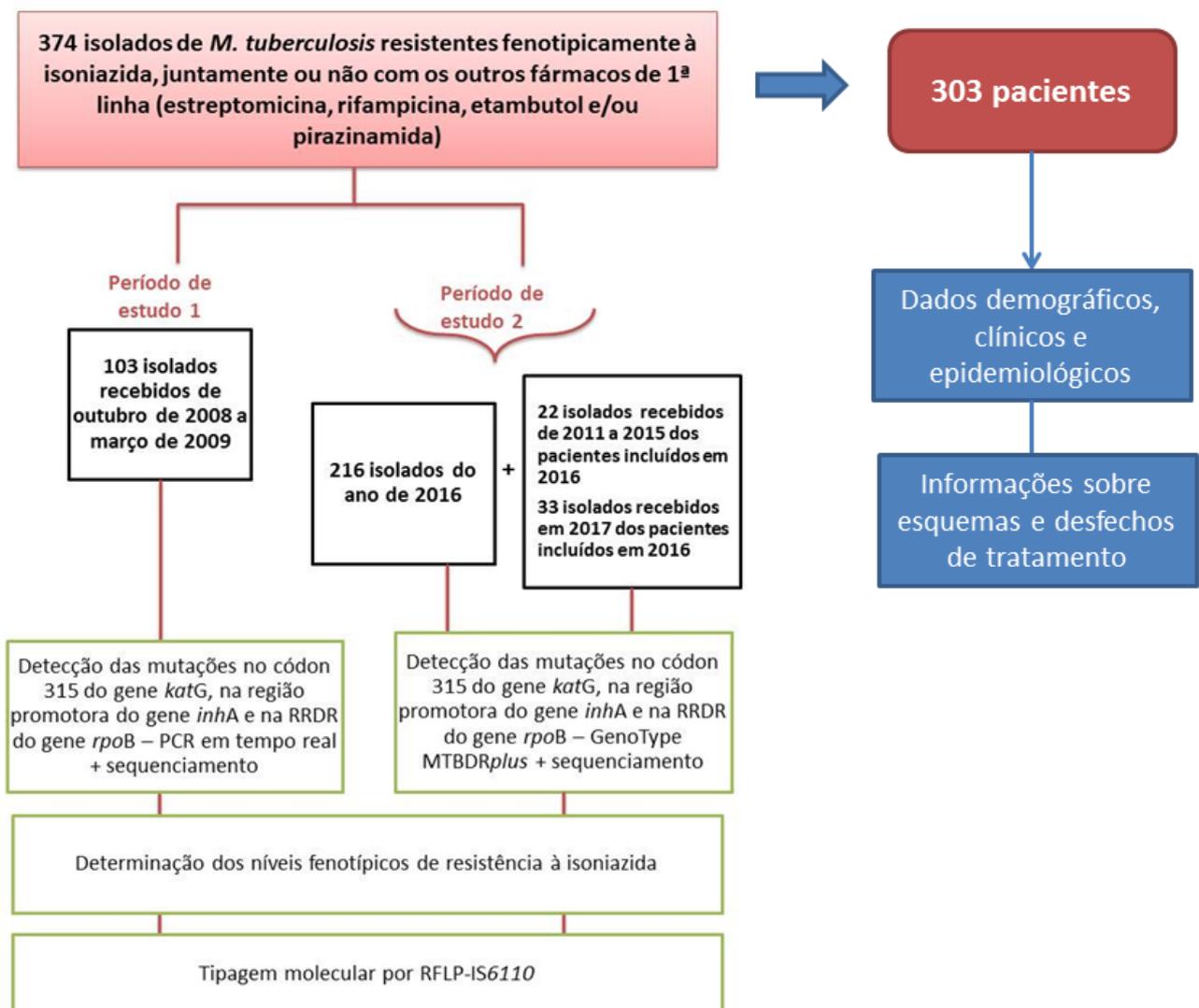


Figura 2. Fluxograma do delineamento do estudo

Os isolados estudados foram classificados de acordo com os resultados obtidos no teste de sensibilidade fenotípico realizado na rotina do NTM pelo método automatizado BACTEC MGIT 960 da seguinte maneira:

- Monorresistentes: isolados com resistência somente à isoniazida;
- Polirresistentes: isolados com resistência à isoniazida e a outro(s) fármaco(s) de 1ª linha, exceto rifampicina;
- MR: isolados com resistência à isoniazida e rifampicina, juntamente ou não com outros fármacos de 1ª linha;
- Pré-XDR: isolados com resistência à isoniazida e rifampicina (juntamente ou não com outros fármacos de 1ª linha) e a uma fluoroquinolona (ofloxacina e/ou levofloxacina) ou a um fármaco injetável de 2ª linha (amicacina e/ou canamicina e/ou capreomicina);
- XDR: isolados com resistência à isoniazida e rifampicina (juntamente ou não com outros fármacos de 1ª linha) e a uma fluoroquinolona (ofloxacina e/ou levofloxacina) juntamente com um fármaco injetável de 2ª linha (amicacina e/ou canamicina e/ou capreomicina).

4.2. Procedimentos laboratoriais

4.2.1. Cultivo dos isolados

Os isolados resistentes à isoniazida anteriores a 2016 (103 isolados do período 1 e 22 isolados do período 2 recebidos antes de 2016) estavam armazenados a -70°C em criotubos com meio Sauton acrescido de 10% de glicerol (Giampaglia et al., 2009) na coleção de isolados do NTM. Estes foram reativados em meio de cultura líquido MGIT suplementado com OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase) (Becton & Dickinson, EUA). Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C durante 20-30 dias. Após este período, os isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade quantitativo à isoniazida e à extração de DNA para a detecção das mutações nos genes *katG*, *inhA* e *rpoB*.

Quanto aos isolados de 2016 (n=216) e de 2017 (n=33), o teste de sensibilidade quantitativo à isoniazida e a extração de DNA foram realizados a partir do crescimento dos tubos controle em MGIT utilizados na realização do teste de sensibilidade durante a rotina diagnóstica do NTM.

4.2.2. Teste de sensibilidade quantitativo à isoniazida pelo método BACTEC MGIT 960

Foi preparada uma solução-estoque de isoniazida (Sigma-Aldrich, EUA) a 10.000 µg/mL diluindo-se o fármaco em água destilada estéril, conforme instruções do fabricante. A partir desta solução, os isolados foram testados frente às concentrações finais de 1 µg/mL, 3 µg/mL e 10 µg/mL (Cambau et al., 2015). Os isolados que cresceram apenas na concentração crítica de 0,1 µg/mL foram considerados como tendo baixo nível de resistência à isoniazida; os isolados que cresceram na concentração de 1 µg/mL e não cresceram em 3 µg/mL e os isolados que cresceram nas concentrações de 1 e 3 µg/mL, mas não cresceram em 10 µg/mL foram considerados com resistência intermediária. Por fim, os isolados que cresceram nas três concentrações foram considerados como apresentando resistência em alto nível.

Para cada isolado, foram utilizados cinco tubos de MGIT com OADC: um tubo controle de crescimento (sem isoniazida), um tubo para cada uma das três diferentes concentrações de isoniazida e um tubo contendo ácido p-nitrobenzóico (PNB) na concentração final de 500 µg/mL, a fim de se confirmar a identificação dos isolados de *M. tuberculosis* (Adami et al., 2017).

Para a preparação do inóculo, os isolados cultivados em MGIT foram inicialmente homogeneizados em vórtex para a dissolução dos precipitados. Após 15 minutos, 1 mL da cultura foi transferido para um tubo de Khan e ajustado à escala 1,0 de MacFarland utilizando-se água destilada estéril. A partir desta suspensão, preparou-se uma diluição de 1:5, da qual 0,5 mL foi inoculado nos tubos contendo isoniazida e PNB. A partir da solução de 1:5, preparou-se uma solução de 1:100, que serviu de inóculo para o tubo

controle do teste. Para cada lote de teste realizado, incluiu-se a cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), que é sensível a todos os fármacos. As suspensões utilizadas como inóculo foram semeadas em ágar BHI e incubadas de 24-48h a 37°C para checar a pureza dos isolados (Adami et al., 2017; Gallo et al., 2017).

A incubação dos testes no equipamento BACTEC MGIT 960 foi realizada de acordo com Rüsç-Gerdes et al. (2006). Os tubos controle e com isoniazida foram colocados em uma estante com capacidade para quatro tubos e incubados no equipamento como *unknown drugs* (fármacos desconhecidos). Os testes foram finalizados pelo equipamento no período de 5 a 13 dias de incubação, após o tubo controle atingir o valor de unidade de crescimento (*growth unit*) de 400. Os testes finalizados foram removidos do equipamento e os resultados, lidos no sistema EpiCenter, versão 6.20A (Becton & Dickinson, EUA).

O isolado foi considerado resistente quando a unidade de crescimento em um ou mais tubos contendo isoniazida foi maior do que 100, conforme interpretação do instrumento BACTEC MGIT 960. Nos casos em que a unidade de crescimento foi menor do que 100 em qualquer um dos tubos com isoniazida, o isolado foi considerado sensível àquela concentração. Os tubos contendo PNB foram incubados separadamente no equipamento e finalizados manualmente após três dias de conclusão do teste de sensibilidade.

4.2.3. Extração de DNA

Para a extração de DNA dos isolados de *M. tuberculosis*, 1 mL do crescimento em MGIT foi transferido para um tubo com tampa de rosca estéril. Os tubos foram aquecidos em termobloco a 95°C por 20 min e armazenados a -20°C (Gallo et al., 2016). Após o congelamento, o processo de aquecimento foi repetido e os isolados foram mantidos a -20°C até a realização das técnicas de biologia molecular.

4.2.4. Detecção de mutações pelo kit GenoType MTBDR*plus* 2.0 (Hain Lifescience, Alemanha)

O kit GenoType MTBDR*plus* 2.0 foi utilizado como um teste de triagem para detectar as principais mutações associadas à resistência à isoniazida (códon 315 do gene *katG* e região promotora do gene *inhA*) e à rifampicina (RRDR do gene *rpoB*) nos isolados do período de estudo 2. No presente estudo, os reagentes de extração de DNA contidos no kit não foram utilizados, pois todos os isolados já haviam sido submetidos à extração de DNA *in house* por termolise.

Seguindo as instruções do fabricante, para cada reação de amplificação de DNA, foram utilizados 10 µL da solução AM-A e 35 µL da solução AM-B. Estes reagentes são componentes do kit e são prontos para uso, contendo todos os componentes necessários para a reação de PCR, incluindo a enzima *Taq* polimerase. Esta etapa foi realizada em sala limpa específica para o preparo de soluções pré-PCR. Em uma sala específica para a adição de DNA, foram adicionados 5 µL do DNA de cada amostra à mistura dos reagentes AM-A e AM-B (Hain Lifescience GmbH, 2012).

Os parâmetros da PCR foram: 1 ciclo a 95°C por 15 min, 10 ciclos a 95°C por 30 s e 65°C por 2 min, 20 ciclos a 95°C por 25 s, 50°C por 40 s e 70°C por 40 s, e um ciclo final de 8 min a 70°C (Hain Lifescience GmbH, 2012). Após a amplificação, os produtos foram armazenados a -20°C até a realização da etapa de hibridação.

A hibridação foi realizada manualmente utilizando o equipamento TwinCubator (Hain Lifescience, Alemanha). Este equipamento permite a hibridação de 12 amostras, cada uma posicionada em uma canaleta (Figura 3).

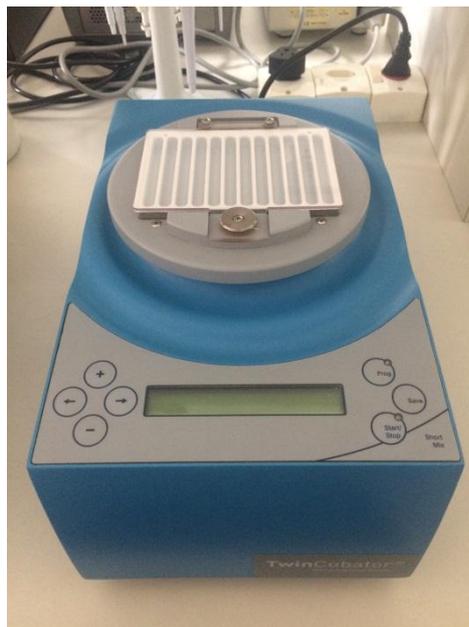


Figura 3. Equipamento Twincubator

Foto: Juliana M. W. Pinhata

Seguindo as instruções do fabricante (Hain Lifescience GmbH, 2012), inicialmente, 20 μ L da solução denaturante (DEN) foram misturados a 20 μ L do produto da PCR em cada canaleta. Então, 1 mL da solução de hibridização (HYB) foi adicionado e as fitas de nitrocelulose foram colocadas nas canaletas. Realizou-se uma incubação a 45°C por 20 min. Após este período, os reagentes foram removidos das canaletas. Adicionou-se 1 mL da solução de lavagem adstringente (STR) e procedeu-se a uma incubação por 10 min a 45°C.

A etapa de detecção consistiu dos seguintes passos: primeiramente, 1 mL do conjugado diluído a 1:100 (10 μ L CON-C + 1 mL CON-D) foi adicionado a cada canaleta e incubado a 37°C por 20 min. Após este período, o conjugado foi removido e as fitas foram lavadas com a solução de lavagem (RIN) durante 1 min e depois com água destilada também por 1 min, à temperatura ambiente. Adicionou-se, então, o substrato diluído a 1:100 (10 μ L SUB-C + 1 mL SUB-D) às fitas, as quais foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente, no escuro. Após a formação nítida das bandas, procedeu-se a remoção do substrato e à interrupção da reação por meio de

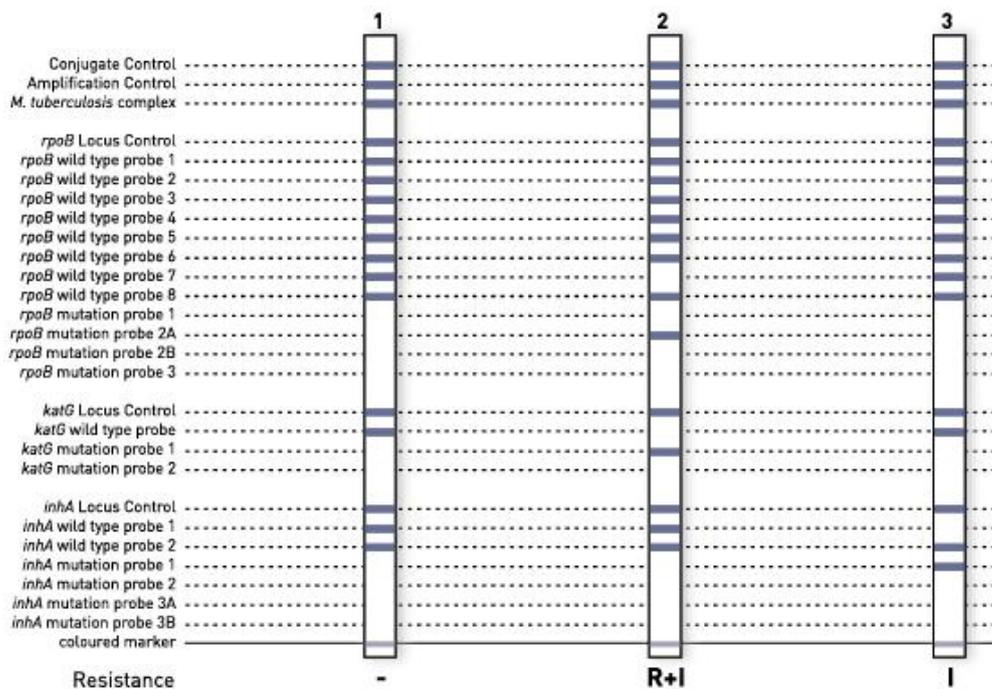


Figura 5. Representação esquemática das fitas do kit GenoType MTBDR $plus$ 2.0 com as sondas para os genes *rpoB*, *katG* e *inhA*

-, resistência ausente, R+I, resistência à rifampicina e isoniazida, I, resistência à isoniazida

Adaptado de <https://www.hain-lifescience.de>

Quadro 9. Localização das mutações nos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* e as bandas selvagens e mutantes correspondentes detectadas pelo kit GenoType MTBDR*plus* 2.0

| Failing wild type band | Codon analyzed | Developing mutation band | Mutation |
|------------------------|----------------|--------------------------|----------|
| <i>katG</i> WT | 315 | <i>katG</i> MUT1 | S315T1 |
| | | <i>katG</i> MUT2 | S315T2 |

| Failing wild type band | Analyzed nucleic acid position | Developing mutation band | Mutation |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------|----------|
| <i>inhA</i> WT1 | -15 | <i>inhA</i> MUT1 | C-15T |
| | -16 | <i>inhA</i> MUT2 | A-16G |
| <i>inhA</i> WT2 | -8 | <i>inhA</i> MUT3A | T-8C |
| | | <i>inhA</i> MUT3B | T-8A |

| Failing wild type band(s) | Codons analyzed | Developing mutation band | Mutation |
|---------------------------|-----------------|--|---|
| <i>rpoB</i> WT1 | 505-509 | | F505L T508A S509T |
| <i>rpoB</i> WT2 | 510-513 | | E510H L511P* |
| <i>rpoB</i> WT2/WT3 | 510-517 | | Q513L* Q513P del514-516 |
| <i>rpoB</i> WT3/WT4 | 513-519 | <i>rpoB</i> MUT1 | D516V D516Y del515 |
| <i>rpoB</i> WT4/WT5 | 516-522 | | del518* N518I |
| <i>rpoB</i> WT5/WT6 | 518-525 | | S522L S522Q |
| <i>rpoB</i> WT7 | 526-529 | <i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B | H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C |
| <i>rpoB</i> WT8 | 530-533 | <i>rpoB</i> MUT3 | S531L S531Q* S531W L533P |

Adaptado de https://www.hain-lifescience.de/include_datei/kundenmodule/packungsbeilage/download.php?id=936

Para identificar resistência à rifampicina, a fita contém sondas de oito regiões do gene *rpoB* do tipo selvagem (WT1 a WT8) e quatro mutantes (MUT1, MUT2A, MUT2B e MUT3). Para detectar resistência à isoniazida, há uma sonda para o tipo selvagem (WT) e duas mutantes para o códon 315 do gene *katG* (MUT1 e MUT2), além de duas sondas para o tipo selvagem (WT1 e WT2) e quatro mutantes (MUT1, MUT2, MUT3A e MUT3B) para a região promotora do gene *inhA*.

A sensibilidade ao fármaco analisado é definida quando há hibridação de uma amostra com todas as sondas do tipo selvagem sem hibridação com as sondas associadas à mutação. Por outro lado, a amostra é considerada resistente quando há hibridação com uma sonda mutante e ausência de hibridação com a sonda selvagem correspondente.

Pode ocorrer também a ausência de hibridação de uma amostra tanto com as sondas mutantes quanto com as sondas selvagens correspondentes, o que significa que se trata de uma alteração diferente das mutações detectadas pelo teste. Neste tipo de situação, a mutação é denominada inferida.

Caso haja hibridação com uma sonda mutante e também com a sonda selvagem correspondente, a amostra pode representar uma população heterogênea de bactérias (heterorresistência) ou uma infecção mista por isolados com diferentes perfis de sensibilidade.

4.2.5. Sequenciamento de DNA

Foi realizado o sequenciamento pelo método de Sanger dos genes *katG* e *inhA* inteiros, além da RRDR de 81 pb do gene *rpoB* nos seguintes casos:

- Isolados nos quais não foram detectadas mutações nas regiões analisadas por PCR em tempo real e sequenciamento no projeto da Maria Gisele Gonçalves, correspondentes ao período 1 do estudo;
- Isolados nos quais não foram detectadas mutações nas regiões analisadas pelo teste GenoType MTBDR*plus*, correspondentes ao período 2 do estudo;
- Isolados nos quais foram detectadas mutações inferidas pelo teste GenoType MTBDR*plus*, isto é, mutações diferentes das identificadas pelas sondas do teste.

Nos casos em que um paciente teve mais de um isolado que seguiu um dos critérios acima e, portanto, precisava ser submetido ao sequenciamento, este foi realizado apenas para os isolados com perfis de resistência fenotípicos aos fármacos de 1^a e/ou 2^a linha diferentes entre si ou para isolados com o mesmo perfil fenotípico, mas que entraram no NTM em anos diferentes.

As seqüências dos iniciadores para as reações de amplificação e sequenciamento dos genes *katG*, *inhA* e *rpoB* estão descritas na Quadro 10.

Quadro 10. Sequências dos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes *katG*, *inhA* e *rpoB* de isolados de *M. tuberculosis*

| Alvo | Nome do iniciador | Seqüência do iniciador (5'-3') | Anelamento (°C) | Tamanho (pb) | Referência |
|--------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------|--------------|-----------------------|
| <i>katG</i> | P4_fw | CGG ACC ATA ACG GCT TCC TG | 62 | 563 | Machado et al., 2013 |
| | P4_rv | TTG TCC AAG CTG GCG TTG TC | | | |
| | P5_fw | CGA CAA CGC CAG CTT GGA C | | 518 | |
| | P5_rv | CGG TTC CGG TGC CAT ACG | | | |
| | P6_fw | AGC TCG TAT GGC ACC GGA AC | | 619 | |
| | P6_rv | TGA CCT CCC ACC CGA CTT GT | | | |
| | P7_fw | ACA AGT CGG GTG GGA GGT C | | 574 | |
| | P7_rv | CTG CCG GTC CAC TTC ACC TT | | | |
| P8_fw | GGG ACC TAC CAG GGC AAG GA | 629 | | | |
| P8_rv | CCG GGA GTC AGC AAG TCA CC | | | | |
| <i>inhA</i> | inhA-1 | CCT CGC TGC CCA GAA AGG GA | 64 | 248 | Morlock et al., 2003 |
| | inhA-2 | ATC CCC CGG TTT CCT CCG GT | | | |
| | inhA-3 | AGG TCG CCG GGG TGG TCA GC | 60 | 517 | Leung et al., 2006 |
| | inhA-4 | AGC GCC TTG GCC ATC GAA GCA | | | |
| | inhA-3F | CCA CAT CTC GGC GTA TTC G | 501 | | |
| | inhA-5R | TTC CGG TCC GCC GAA CGA CAG | | | |
| <i>rpoB</i> | rpoB-1 | GGG AGC GGA TGA CCA CCC A | 60 | 350 | Portugal et al., 1999 |
| | rpoB-2 | GCG GTA CGG CGT TTC GAT GAA C | | | |

As reações de PCR foram compostas por 5 µL de tampão 5X GoTaq Flexi, 1,5 µL de MgCl₂ a 25mM, 2,5 µL de dNTPs a 2 mM, GoTaq G2 Flexi DNA polimerase a 5U/µL (Promega, EUA), 0,25 µL dos oligonucleotídeos a 20 pmol/µL, 5 µL do DNA da amostra e água ultrapura até o volume final de 25 µL. A amplificação consistiu em 1 ciclo de 94°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 94°C por 1 min, 62°C (*katG*) ou 64°C (*inhA* 1-2) ou 60°C (*inhA* 3-4, *inhA* 3F-5R e *rpoB*) por 1 min e 72°C por 1 min, e um ciclo de 72°C por 10 min.

Para confirmação da amplificação, todos os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X, realizada a 100 V por 45 min.

O produto da PCR foi purificado com ExoSAP-it (Thermo Fischer Scientific, EUA), segundo instruções do fabricante. Após a purificação, as amostras foram submetidas à quantificação de DNA pelo equipamento NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, EUA) e diluídas a 20 ng/μL para serem sequenciadas.

A reação de sequenciamento foi realizada com o kit Big Bye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA) em placa de 96 orifícios, em um volume total de 10 μL para cada amostra, composto de 1 μL do produto da PCR purificado, 1 μL de tampão 5X, 1 μL dos iniciadores a 3,2 pmol/μL, 0,5 μL de Big Dye e 10 μL de água ultrapura qsp. A amplificação foi composta por 40 ciclos de 94°C por 10 s, 55°C por 10 s e 60°C por 4 min.

Após esta etapa, os produtos foram purificados por precipitação com etanol/EDTA de acordo com o protocolo Big Dye Terminator v3.1, com algumas modificações, da seguinte maneira: a placa contendo as amostras foi centrifugada a 1.000 rpm por 10 s. Foram adicionados 2,5 μL de EDTA a 125 mM (pH 8,0) e 30 μL de etanol a 100% em cada poço, a placa foi selada e centrifugada a 3.700 rpm a 15°C por 45 min. A placa foi aberta e invertida bruscamente sobre a pia para a remoção mecânica dos reagentes contidos nos orifícios. Na seqüência, ela foi pressionada sobre papel absorvente para secagem, colocada de maneira invertida sobre papel absorvente e então centrifugada a 1000 rpm por 10 s. Adicionou-se 30 μL de etanol a 70% em cada poço e centrifugou-se a placa a 3.700 rpm a 15°C por 15 min. O sobrenadante foi descartado e a placa foi centrifugada invertida sobre papel absorvente em dois pulsos de 1.000 rpm cada. Ao final, a placa foi selada e mantida a -20°C até ser efetuado o sequenciamento.

Antes do sequenciamento, 10 μL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) foram adicionados e a placa foi homogeneizada. Procedeu-se à centrifugação da placa a 1.000 rpm por 5 s, aquecimento a 94°C por 2 min em termociclador para separação das duplas-fitas de DNA, banho de gelo

por 3 min e realização do sequenciamento no aparelho 3500xLGenetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA).

Para a análise das seqüências, foram utilizados os programas BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.2.5 (Hall, 1999) e SeqManII v. 5.03 (DNASTAR) e as ferramentas MUBII-TB-DB (Flandrois et al., 2014) e BLAST (Altschul et al., 1990).

4.2.6. Tipagem molecular por RFLP-IS6110

A extração e purificação de DNA dos isolados para a tipagem molecular foram realizadas de acordo com protocolo de van Soolingen et al. (1991). O método de RFLP-IS6110 foi realizado conforme o protocolo recomendado por van Embden et al. (1993).

O perfil genético de cada isolado foi analisado com o auxílio do programa Bionumerics v. 7.1 (Applied Maths, Bélgica), com base em uma cópia digitalizada das membranas, após alinhamento dos fragmentos de DNA dos isolados estudados com os da cepa de referência Mt 14323. Foi avaliado o número de cópias da IS6110 de acordo com os fragmentos de DNA hibridados com a sonda, visualizados em forma de bandas na membrana de náilon. Os perfis genéticos foram comparados quanto ao número de cópias da IS6110 e peso molecular das bandas pelo método UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Dice, com margem de 1,5% de tolerância.

A comparação dos perfis genéticos, designados pela abreviação “SP” (São Paulo) seguida por números e letras, resultou na classificação dos isolados em pertencentes ou não a um grupo genético. Isolados que apresentaram o mesmo número de bandas com o mesmo peso molecular ou apresentaram até uma banda de diferença, foram classificados como pertencentes a um mesmo grupo genético ou cluster (Gallo, 2017b).

A comparação dos perfis genéticos foi realizada com auxílio do programa Epi Info (Centers for Disease Control and Prevention, EUA) e do programa Bionumerics.

4.2.7. Fontes de dados

Dados demográficos, clínicos e epidemiológicos dos pacientes incluídos no estudo foram obtidos do sistema *web* TB-WEB, cuja finalidade é a notificação e o acompanhamento dos pacientes com TB no estado de São Paulo. Este sistema está disponível no *site* do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) “Prof. Alexandre Vranjac” do estado de São Paulo (<http://www.cve.saude.sp.gov.br/tbweb/index.jsp>) e o acesso é realizado mediante liberação de senha. Para consulta no sistema TB-WEB, foi utilizado o nome completo e/ou a data de nascimento dos pacientes, a fim de verificar se eles foram notificados e tratados.

Informações mais detalhadas sobre os medicamentos utilizados no tratamento dos pacientes foram obtidas do sistema *web* denominado SITE-TB (Sistema de Informação de Tratamentos Especiais da Tuberculose), desenvolvido pelo Ministério da Saúde (<http://sitetb.saude.gov.br/>), que se destina à notificação e ao acompanhamento dos casos de TB que têm indicação de tratamentos especiais pela ocorrência de reações adversas, toxicidade ou certas comorbidades que impossibilitem o uso do esquema básico, ou por resistência aos medicamentos. O sistema também possibilita a notificação e acompanhamento de casos de outras micobacterioses.

Antes da criação do SITE-TB, os casos de TB resistente no Brasil eram monitorados pelo Sistema TBMR, criado em 2004. Este sistema tinha como objetivos aprimorar a notificação e acompanhar as pessoas com TB-MR, fortalecer e descentralizar o Programa de Vigilância Epidemiológica da TB-MR, permitir a realização de avaliações e pesquisas por meio da manutenção do sistema de informação atualizado e controlar a logística de medicamentos específicos nos níveis central e periférico. Buscando-se aprimorar o Sistema TBMR, foi desenvolvido o sistema SITE-TB, implantado nacionalmente em 2013. Além de possibilitar o monitoramento de todas as pessoas com TB fármaco-resistente no Brasil, este sistema também permite a realização do controle dos fármacos anti-TB (Bartholomay et al., 2019).

Os pacientes incluídos no estudo foram classificados como se segue (Ministério da Saúde, 2019):

- Caso novo: paciente que nunca utilizou medicamentos para TB ou que fez uso desses medicamentos por um período inferior a 30 dias;
- Recidiva: paciente que foi tratado anteriormente e recebeu alta por cura, seja esta comprovada ou após a completitude do tratamento;
- Retratamento após abandono: paciente tratado anteriormente por mais de 30 dias, tendo deixado de tomar os medicamentos durante 30 dias consecutivos ou mais;
- Retratamento após falência: paciente que reiniciou um novo esquema de tratamento por resistência medicamentosa. A resistência pode ter sido comprovada por meio de teste de sensibilidade ou inferida devido a evolução desfavorável do paciente;
- Retratamento após mudança de esquema por toxicidade ou intolerância: paciente que apresentou intolerância medicamentosa ou manifestações de toxicidade que motivaram a mudança do esquema terapêutico (CVE, 2008).

Os critérios para desfecho de tratamento estão descritos a seguir (CVE, 2008; Ministério da Saúde, 2019):

- Cura: paciente com duas baciloscopias negativas, sendo uma em qualquer mês de acompanhamento e outra ao final do tratamento (5^o ou 6^o mês). Para os casos com tratamento prolongado, são considerados os dois últimos meses. Também é considerada alta por cura quando o paciente completou o tratamento sem evidência de falência e recebeu alta com base em critérios clínicos e radiológicos, por impossibilidade de realização da baciloscopia;
- Abandono: paciente que fez uso dos medicamentos durante 30 dias ou mais, interrompendo o tratamento por 30 dias consecutivos ou mais;

- Falência: paciente que apresentou resistência evidenciada pelo teste de sensibilidade a um ou mais fármacos do tratamento; paciente que persistiu com baciloscopia de escarro positiva ao final do tratamento; paciente que manteve baciloscopia positiva até o 4º mês de tratamento; paciente com baciloscopia positiva no início do tratamento seguida de negatificação e de novos resultados positivos por dois meses consecutivos a partir do 4º mês de tratamento; ou paciente que apresentou piora clínica e/ou radiológica durante o tratamento;
- Óbito por TB: quando o óbito apresentar a TB como causa básica;
- Óbito por outras causas (óbito não TB): quando a causa básica não foi a TB, mas ela consta como causa associada. Óbitos de pacientes portadores de HIV são considerados nesta categoria;
- Transferência: paciente que foi transferido para outro serviço de saúde para continuar o tratamento;
- Mudança de diagnóstico: quando o diagnóstico de TB é descartado após a notificação do caso.

4.2.8. Análise dos dados

As datas de recebimento dos isolados no NTM serviram como base para determinar o tipo de caso e qual tratamento seriam incluídos na análise. Sendo assim, a partir da data em que o isolado chegou ao NTM foram levantadas as informações referentes ao tratamento que compreendia aquela data, levando-se em consideração um período de cerca de 30 dias retrospectivos correspondentes ao isolamento, crescimento e envio do isolado para o NTM.

Para análise dos desfechos, foram utilizadas duas abordagens:

1. Para os casos em que a resistência não havia sido detectada anteriormente, ou seja, quando o teste de sensibilidade ainda não havia sido realizado, mesmo que o paciente não fosse um caso novo de TB, foi analisado o desfecho do tratamento posterior ao tratamento no qual a resistência foi detectada. Visto que após o recebimento de um resultado de resistência, o tratamento é encerrado como “falência”, optou-se por analisar o desfecho do tratamento seguinte ao qual foi detectada a resistência, cujo esquema terá sido modificado de acordo com o resultado do teste de sensibilidade.
2. Para os casos com resistência conhecida anteriormente, considerou-se para análise o desfecho do tratamento referente à data de recebimento do isolado no NTM, pois este tratamento já poderia ter sido modificado de acordo com o resultado do teste de sensibilidade.

O teste do qui-quadrado de Pearson com correção de Yates e o teste exato de Fisher foram utilizados para análises comparativas entre os grupos. Considerou-se como estatisticamente significativo um valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil de resistência fenotípico dos isolados de *M. tuberculosis* aos fármacos de 1ª e 2ª linha

Foram analisados 374 isolados de *M. tuberculosis* resistentes à concentração de 0,1 µg/mL de isoniazida pelo teste de sensibilidade no BACTEC MGIT 960, realizado na rotina do NTM. Destes, 216 (57,8%) foram recebidos no ano de 2016, enquanto 103 (27,5%) foram recebidos no período de outubro de 2008 a março de 2009. O restante dos 55 isolados (14,7%) foi obtido entre os anos 2011 a 2015 e em 2017 e correspondiam aos pacientes que deram entrada no ano de 2016 (Tabela 1).

Tabela 1. Número e proporção dos isolados de *M. tuberculosis* incluídos no estudo de acordo com o ano de recebimento pelo Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses

| Ano de recebimento | Nº de isolados | Proporção (%) |
|--------------------|----------------|---------------|
| 2008 | 45 | 12,0 |
| 2009 | 58 | 15,5 |
| 2011 | 1 | 0,3 |
| 2012 | 2 | 0,5 |
| 2013 | 5 | 1,3 |
| 2014 | 4 | 1,1 |
| 2015 | 10 | 2,7 |
| 2016 | 216 | 57,8 |
| 2017 | 33 | 8,8 |
| Total | 374 | 100,0 |

No ano de 2016, 4.192 isolados de *M. tuberculosis* foram testados frente à isoniazida e rifampicina por BACTEC MGIT 960 (teste de sensibilidade de 1ª linha) na rotina do NTM, dos quais 216 se mostraram resistentes pelo menos à isoniazida. Sendo assim, a prevalência desta resistência no estado de São Paulo para o ano de 2016 foi de 5,2%.

Do total de 374 isolados estudados, 342 (91,4%) tiveram origem pulmonar, enquanto oito (2,2%) eram de origem extrapulmonar. Para 23 (6,1%) isolados o material foi cadastrado no sistema laboratorial como cepa, não sendo possível identificar a fonte de isolamento (Tabela 2).

Tabela 2. Origem de isolamento dos 374 isolados de *M. tuberculosis* incluídos no estudo

| Material clínico | Número de isolados | Proporção (%) |
|----------------------------|---------------------------|----------------------|
| Aspirado/secreção traqueal | 2 | 0,5 |
| Cepa* | 23 | 6,1 |
| Escarro | 332 | 88,8 |
| Fragmento de tecido ósseo | 1 | 0,3 |
| Lavado broncoalveolar | 8 | 2,1 |
| Linfonodo cervical | 1 | 0,3 |
| Líquido cefalorraquidiano | 2 | 0,5 |
| Líquido pleural | 3 | 0,8 |
| Sangue | 1 | 0,3 |
| Não informado | 1 | 0,3 |
| Total | 374 | 100 |

*material clínico cadastrado como cepa no sistema pelos laboratórios requisitantes

Os 374 isolados analisados corresponderam a 303 pacientes diferentes, sendo que 261 (86,1%) deles tiveram somente um isolado incluído no estudo (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos 374 isolados de *M. tuberculosis* correspondentes aos 303 pacientes incluídos no estudo

| Nº isolados por paciente | Nº pacientes (n=303) | Proporção (%) |
|--------------------------|----------------------|---------------|
| 1 | 261 | 86,1 |
| 2 | 29 | 9,6 |
| 3 | 7 | 2,3 |
| 4 | 3 | 1,0 |
| 5 | 1 | 0,3 |
| 6 | 1 | 0,3 |
| 11 | 1 | 0,3 |

Quanto ao perfil de resistência fenotípico, do total de 374 isolados, 165 (44%) foram monorresistentes à isoniazida, enquanto 47 (13%) foram polirresistentes, 122 (33%) MR, 24 (6%) pré-XDR e 16 (4%) XDR (Figura 6).

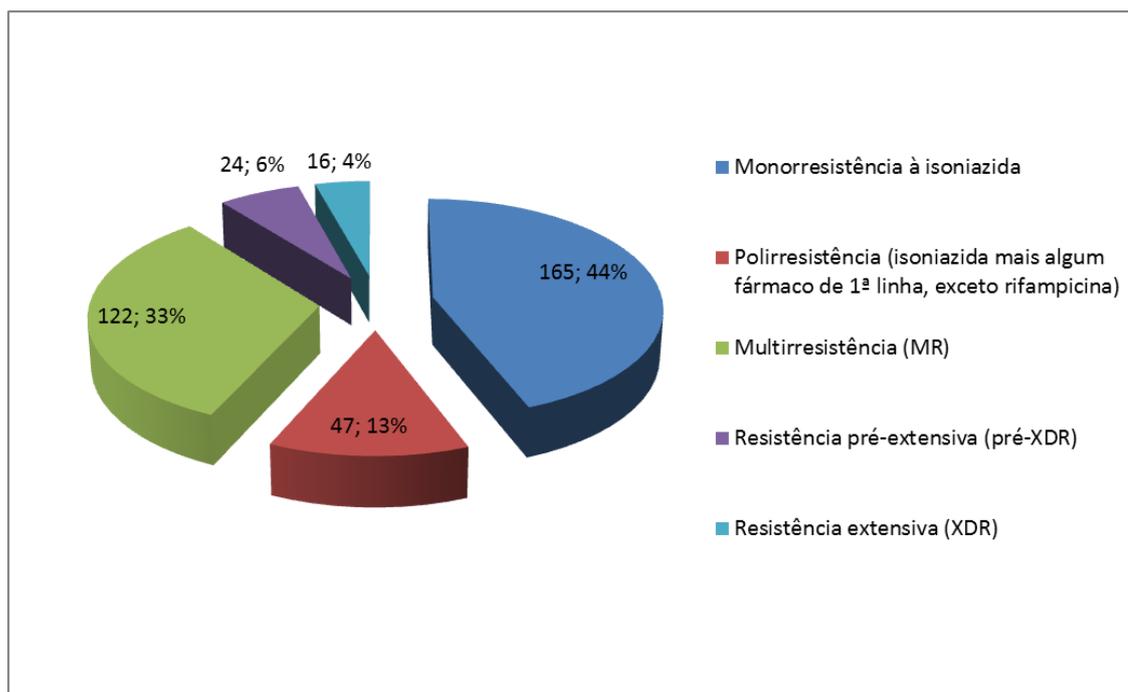


Figura 6. Perfil de resistência fenotípica dos 374 isolados de *M. tuberculosis* incluídos no estudo

O teste de sensibilidade aos fármacos de 2ª linha foi realizado para 270 (72,2%) dos 374 isolados. Entre os 104 isolados que não foram submetidos ao teste, 37 (35,6%) eram monorresistentes à isoniazida, 12 (11,5%) eram polirresistentes e 55 (52,9%) MR.

Dos 37 isolados monorresistentes, 31 eram do período de 2008-2009, um de 2011, um de 2012, dois de 2013 e dois de 2015. Todos os isolados polirresistentes e MR eram do período de 2008-2009, quando o teste para os fármacos de 2ª linha ainda não era realizado de rotina para todos os pacientes que apresentassem resistência à isoniazida e/ou rifampicina.

Dos 24 isolados pré-XDR, 21 (87,5%) eram resistentes à ofloxacina e/ou levofloxacina, enquanto três (12,5%) eram resistentes a um, dois ou a todos os fármacos injetáveis (amicacina, canamicina e capreomicina). Dos 16 isolados XDR, nove (56,3%) foram resistentes a todos os fármacos de 2ª linha testados (Tabela 4).

Tabela 4. Perfil de resistência aos fármacos de 2ª linha dos isolados de *M. tuberculosis* extensivamente resistentes

| Perfil de resistência | Nº isolados | Frequência (%) |
|------------------------------|--------------------|-----------------------|
| AMI+CAN+OFL | 2 | 12,5 |
| AMI+OFL+LEV | 1 | 6,25 |
| CAP+AMI+CAN+LEV | 6 | 37,5 |
| CAP+AMI+CAN+OFL | 2 | 12,5 |
| CAP+AMI+CAN+OFL+LEV | 1 | 6,25 |
| CAP+AMI+LEV | 1 | 6,25 |
| CAP+LEV | 3 | 18,75 |
| Total | 16 | 100 |

AMI: amicacina, CAN: canamicina, OFL: ofloxacina, LEV: levofloxacina, CAP: capreomicina

5.2. Nível de resistência à isoniazida dos isolados de *M. tuberculosis* testados pelo método quantitativo automatizado BACTEC MGIT 960

Inicialmente, os 374 isolados resistentes a 0,1 µg/mL de isoniazida (concentração usada no teste de sensibilidade de rotina) incluídos no estudo foram testados frente a três concentrações de isoniazida (1, 3 e 10 µg/mL) para a determinação do nível fenotípico de resistência a este fármaco. Após esta etapa, para os isolados do período de estudo 2, foi realizada a triagem das mutações no códon 315 do gene *katG*, na região promotora do gene *inhA* e na RRDR do gene *rpoB* pelo teste GenoType MTBDR*plus*. Como os resultados de sequenciamento dos isolados do período de estudo 1 já eram conhecidos, comparou-se as mutações encontradas com os níveis de resistência à isoniazida obtidos para todos os isolados. Ao se analisar todos esses resultados em conjunto, verificou-se que 37 (9,9%) dos 374 isolados haviam crescido somente na concentração crítica de 0,1 µg/mL de isoniazida e não apresentavam mutações em nenhuma das regiões dos genes *katG* e *inhA* analisadas. Sendo assim, estes isolados foram novamente semeados em meio líquido de 7H9 com OADC e testados frente à concentração de 0,1 µg/mL de isoniazida, para confirmar a resistência fenotípica. Após a repetição do teste, sete isolados se mostraram sensíveis à isoniazida fenotipicamente, concordando com o resultado genotípico. Destes sete isolados, seis eram inicialmente monorresistentes à isoniazida e um polirresistente. Portanto, do total de 374 isolados analisados, 367 foram fenotipicamente resistentes à isoniazida, sendo que destes 115 (31,3%) apresentaram baixo nível de resistência, 205 (55,9%) resistência intermediária (84 (22,9%) tiveram CIM >1<3 µg/mL e 121 (33%) tiveram CIM >3<10 µg/mL) e 47 (12,8%) alto nível de resistência.

A Figura 7 mostra os níveis de resistência à isoniazida de acordo com o perfil de resistência fenotípico aos fármacos de 1ª e 2ª linha dos 367 isolados fenotipicamente resistentes à isoniazida. A proporção de isolados monorresistentes com baixo nível de resistência à isoniazida (56,6%, 90/159) foi maior quando comparada aos isolados polirresistentes (15,2%, 7/46, $p < 0,0001$), MR (14%, 17/122, $p < 0,0001$), pré-XDR (0/24, $p < 0,0001$) e

XDR (6,25%, 1/16, $p= 0,0002$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os isolados polirresistentes, MR, pré-XDR e XDR com relação ao nível de resistência.

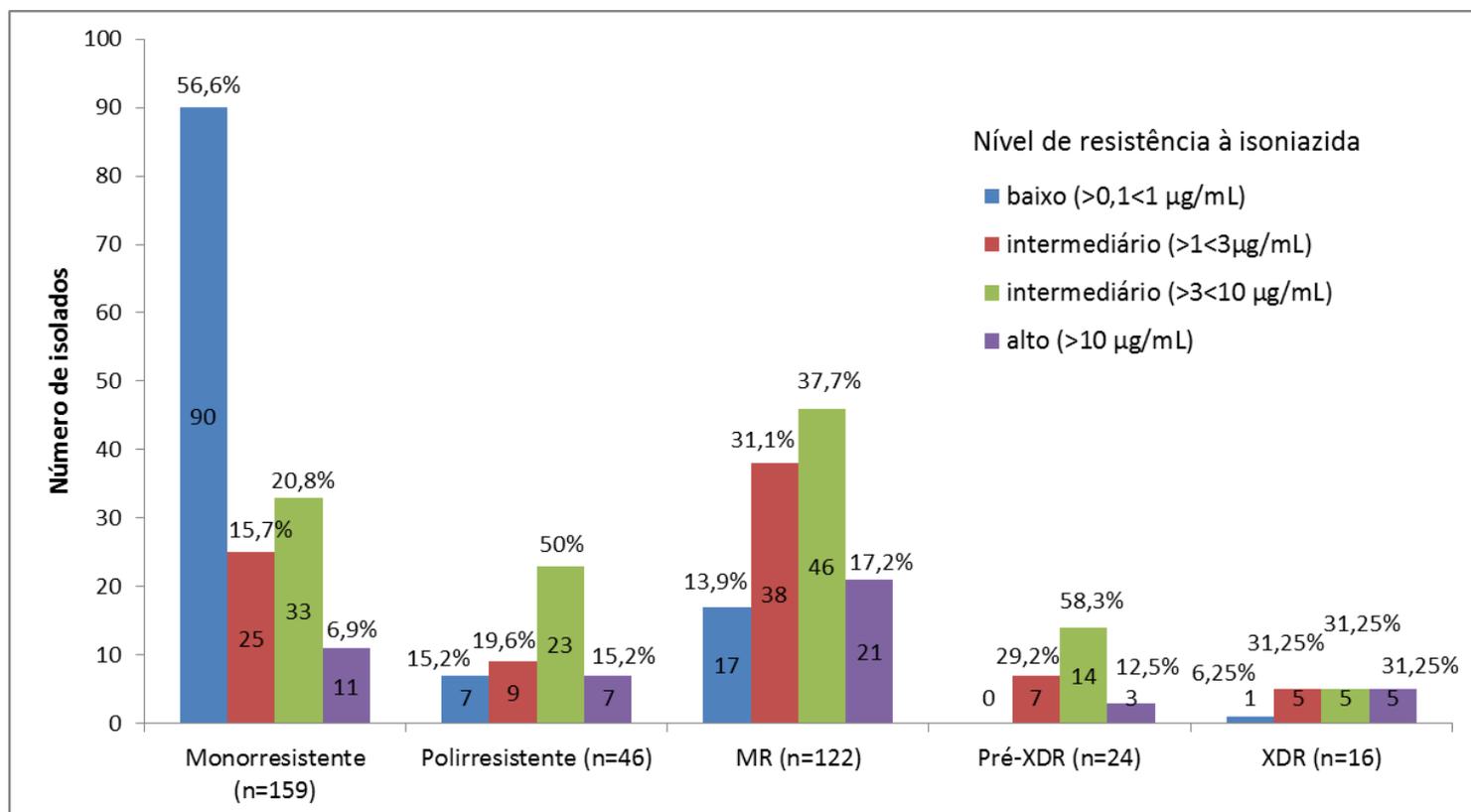


Figura 7. Perfil fenotípico de resistência e níveis de resistência à isoniazida dos isolados de *M. tuberculosis*

5.3. Perfil das mutações nos genes *katG* e *inhA* e na RRDR do gene *rpoB*

Considerando os 367 isolados de *M. tuberculosis* resistentes fenotipicamente à isoniazida e submetidos à identificação das mutações no códon 315 do gene *katG*, na região promotora do gene *inhA* e na RRDR do gene *rpoB* por PCR em tempo real e sequenciamento (período de estudo 1) ou pelo kit GenoType MTBDR $plus$ (período de estudo 2), 159 (43,3%) isolados apresentaram mutações no códon 315 do *katG*, 100 (27,2%) apresentaram mutações no promotor do *inhA*, 18 (4,9%) apresentaram

mutações em ambos os alvos e 90 (24,5%) não apresentaram mutação em nenhum dos dois alvos. Quanto ao *rpoB*, 173 (47,1%) dos 367 isolados estudados apresentaram mutações, enquanto 194 (52,9%) não apresentaram mutação neste gene.

A distribuição das mutações de acordo com o perfil fenotípico de resistência aos fármacos de 1ª e 2ª linha dos 367 isolados aparece na Figura 8. Os isolados monorresistentes apresentaram menor proporção de mutações no códon 315 do gene *katG* (24,5%, 39/159) quando comparados aos polirresistentes (58,7%, 27/46, $p < 0,0001$), MR (55,7%, 68/122, $p < 0,0001$), pré-XDR (54,2%, 13/24, $p = 0,01$) e XDR (75%, 12/16, $p = 0,0002$) (Figura 8).

Com relação ao promotor do *inhA*, os isolados monorresistentes tiveram mais mutações neste sítio (42,8%, 68/159) do que os polirresistentes (6,5%, 3/46, $p < 0,0001$), MR (17,2%, 21/122, $p < 0,0001$), pré-XDR (33,3%, 8/24, $p = 0,01$) e XDR (0/16, $p = 0,0002$) (Figura 8).

Nenhum dos 159 isolados monorresistentes apresentou mutações simultaneamente no códon 315 do *katG* e no promotor do *inhA*, enquanto 15,2% (7/46), 4,9% (6/122), 8,3% (2/24) e 18,8% (3/16) dos isolados polirresistentes, MR, pré-XDR e XDR, respectivamente, apresentaram mutações em ambos os genes. Por sua vez, a ausência de mutações tanto no códon 315 do *katG* como no promotor do *inhA* foi mais alta entre os isolados monorresistentes (32,7%, 52/159) em comparação aos polirresistentes (19,6%, 9/46, $p = 0,12$), MR (22,1%, 27/122, $p = 0,07$), pré-XDR (4,2%, 1/24, $p = 0,004$) e XDR (6,3%, 1/16, $p = 0,04$) (Figura 8).

Com relação à região RRDR do gene *rpoB*, 4,4% (7/159) dos isolados monorresistentes à isoniazida e 19,6% (9/46) dos isolados polirresistentes apresentaram mutações nesta região ou seja, 16 isolados com mutações no *rpoB* foram sensíveis à rifampicina no teste de sensibilidade fenotípico. As frequências de mutação no *rpoB* foram de 95,9% (117/122), 100% (24/24) e 100% (16/16) para os isolados MR, pré-XDR e XDR, respectivamente (Figura 8).

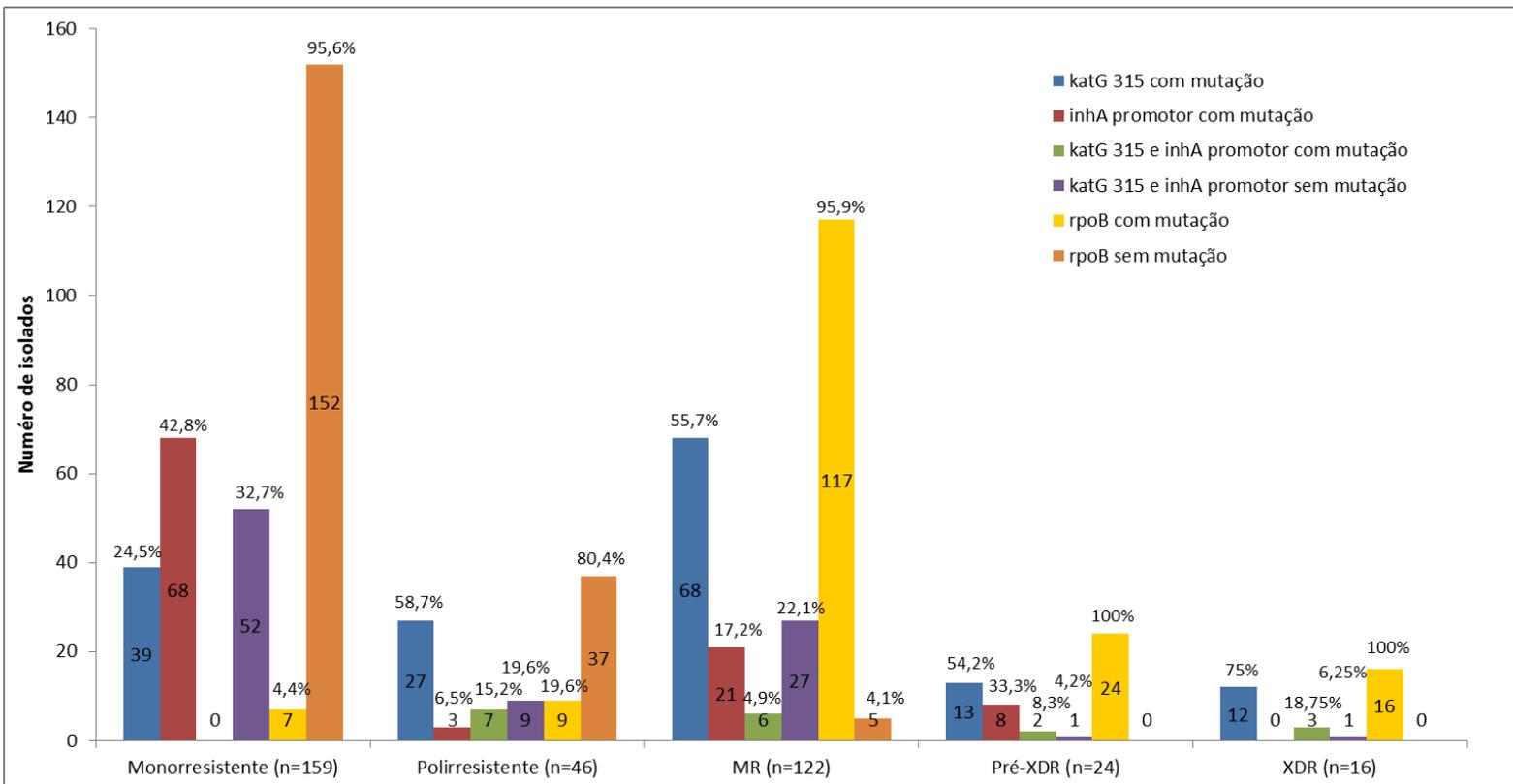


Figura 8. Perfil fenotípico de resistência e proporções das mutações encontradas nos genes *katG*, *inhA* e *rpoB*

Considerando o total de 177 isolados que apresentaram mutações no códon 315 do *katG* (159 isolados com mutação somente no *katG* e 18 no *katG* e no *inhA*), 166 (93,8%) tiveram a mutação Ser315Thr (AGC>ACC) (Tabela 5).

Tabela 5. Tipos de mutação no códon 315 do gene *katG* apresentados pelos 177 isolados de *M. tuberculosis*

| Tipo de mutação | Nº isolados | Proporção (%) |
|---------------------------------------|--------------------|----------------------|
| Ser315Thr (AGC>ACC) | 166 | 93,8 |
| Ser315Thr (AGC>ACA) | 2 | 1,1 |
| Ser315Thr (AGC>ACG) | 1 | 0,6 |
| Ser315Asn (AGC>AAC) | 2 ^a | 1,1 |
| Ser315Asn (AGC>AAC) + A506T (GCC>ACC) | 2 ^b | 1,1 |
| Deleção 315AGC | 2 | 1,1 |
| Ser315Arg (AGC>AGA) | 1 | 0,6 |
| Ser315Arg (AGC>CGC) | 1 | 0,6 |
| Total | 177 | 100 |

^a para um isolado, o teste GenoType MTBDR*plus* detectou esta mutação como inferida no códon 315 do *katG*; o outro isolado era de 2008 e teve esta mutação identificada por sequenciamento

^b para ambos os isolados, o teste GenoType MTBDR*plus* detectou a mutação Ser315Asn (AGC>AAC) como inferida no códon 315 do *katG*

Quanto à mutação C-15T na região promotora do gene *inhA*, 108 (91,5%) dos 118 isolados apresentaram mutações neste alvo (100 isolados com mutação somente nesta região e nos 18 isolados com mutação também no códon 315 do gene *katG*), enquanto que os 10 (8,5%) isolados restantes tiveram a mutação G-17T (Tabela 6).

Tabela 6. Tipos de mutação apresentados pelos 118 isolados de *M. tuberculosis* com mutação na região promotora do gene *inhA*

| Tipo de mutação | Nº isolados | Proporção (%) |
|-----------------|-------------|---------------|
| C-15T | 108* | 91,5 |
| G-17T** | 10*** | 8,5 |
| Total | 118 | 100 |

* 8 isolados também apresentaram mutações no códon 315 do *katG*, sendo que 5 deles tinham a mutação Ser315Thr (AGC>ACC), um apresentou deleção do códon 315 (AGC) e dois apresentaram mutação inferida pelo teste GenoType MTBDR_{plus}

** mutação identificada por sequenciamento em 4 isolados de 2008-2009; nos 6 isolados restantes, esta mutação foi detectada como inferida pelo teste GenoType MTBDR_{plus}

*** todos os isolados apresentaram também a mutação Ser315Thr (AGC>ACC) no *katG*

Todos os 90 isolados fenotipicamente resistentes à isoniazida sem mutação detectada tanto no códon 315 do *katG* como no promotor do *inhA* foram submetidos ao sequenciamento dos genes *katG* e *inhA* inteiros. Destes, 47 (52,2%) não apresentaram mutação em nenhum dos genes. Os tipos de mutação encontrados nos 43 (47,8%) isolados restantes estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Tipos de mutação encontrados nos 43 isolados de *M. tuberculosis* submetidos ao sequenciamento dos genes *katG* e *inhA* inteiros

| Códon e tipo de mutação | Número de isolados |
|---|--------------------|
| Gene <i>katG</i> (N=40) | |
| 98 Tyr>Cys (TAC>TGC) | 1 |
| 106 Ala>Val (GCG>GTG) | 1 |
| 122 Ala>Gly (deleção CGGCGGCGC) | 1 |
| 152 Lys>Asn (AAG>AAC) | 1 |
| 191 (deleção G) + 463 Arg>Leu (CGG>CTG) | 1 |
| 204 TGG>TGA (códon de parada) | 1 |

| | |
|---|----------|
| 232 Pro>Ala (CCC> GCC) | 1 |
| 232 Pro>Thr (CCG> ACG) | 2* |
| 233 Glu>Gly (inserção T) | 1 |
| 259 Asp>Gly (GAC> GGC) | 3 |
| 299 Gly>Cys (GGC> TGC) + WT** | 1 |
| 300 Trp>Arg (TGG> CGG) + 549 Cys>Gly (TGT> GGT) | 6 |
| 315 Ser>Arg (AGC> AGG) + WT** | 1 |
| 328 Trp>Cys (TGG>TGC) | 1 |
| 381 Asp>Asn (GAC> AAC) + 611 Leu>Leu (C>T) | 1 |
| 419 Asp>His (GAC> CAC) | 1 |
| 438 Trp>Arg (TGG> CGG) + WT** | 1 |
| 439 Gln>Arg (CAG> CGG) | 1 |
| 440 Asp>Tyr (GAT> TAT) | 1 |
| 463 Arg>Leu (CGG> CTG) + 478 Ala>Arg (deleção G) | 1*** |
| 497 Ile>Thr (ATC> ACC) | 1 |
| 542 Asp>Ala (GAC> GCC) | 1 |
| 549 Cys>Gly (TGT> GGT) | 1 |
| 566 Pro>Ala (CCC> GCC) | 1 |
| 590 Lys>Arg (deleção A) | 1 |
| 600 Lys>Ile (inserção T) | 1 |
| 660 Asn>Asp (AAC> GAC) + WT** | 1 |
| 668 Trp>Gly (TGG> TAC) | 1 |
| 680 Gly>Arg (GGC> CGC) | 2 |
| 726 Ala>Thr (GCT> ACT) | 1 |
| 728 Trp>Gly (TGG> GGG) | 1 |
| Gene <i>inhA</i> (N=4) | |
| 76 Gly>Gly (C>T) | 1*** |
| 94 Ser>Ala (TCG> GCG) | 3 |
| <hr/> Total | <hr/> 43 |

* um dos dois isolados com esta mutação apresentou genótipo misto com o de uma população selvagem (WT)

** estes isolados apresentaram genótipo misto com o de uma população selvagem (WT)

*** um isolado com mutação em ambos os genes

Com relação aos 173 isolados com mutações no gene *rpoB*, 116 (67,1%) isolados apresentaram mutações no códon 531, sendo que 115 deles tinham a mutação Ser531Leu (TCG>TTG). Mutações inferidas foram detectadas em 28 (16,2%) isolados, enquanto 15 (8,7%) isolados apresentaram mutações no códon 526 e 12 (6,9%) no códon 516. Um (0,6%) isolado apresentou mutação no códon 522 e o outro (0,6%) apresentou mutações tanto no códon 516 como no 531 (Tabela 8).

Tabela 8. Tipos de mutação encontrados nos 173 isolados de *M. tuberculosis* com mutação na região determinante de resistência à rifampicina do gene *rpoB*

| Códon e tipo de mutação | Nº isolados | Proporção (%) |
|---|--------------------|----------------------|
| Inferidas | 28 | 16,2 |
| 516 Asp>Val (GAC>GTC) | 12 | 6,9 |
| 522 Ser>Leu (TCG>TTG) | 1 | 0,6 |
| 526 | | |
| His>Cys (CAC> TGC) | 1 | 0,6 |
| His>Asp (CAC> GAC) | 5 | 2,9 |
| His>Leu (CAC>CTC) | 2 | 1,2 |
| His>Tyr (CAC>TAC) | 7 | 4,0 |
| 531 | | |
| Ser>Leu (TCG>TTG) | 115 | 66,5 |
| Ser>Trp (TCG> TGG) | 1 | 0,6 |
| 516 Asp>Val (GAC>GTC) + 531 Ser>Leu (TCG>TTG) | 1 | 0,6 |
| Total | 173 | 100 |

Entre as 28 mutações inferidas detectadas no *rpoB*, a maior frequência ocorreu no códon 526 (n=14, 50%), seguido pela mutação Ser>Trp (TCG>**TGG**) no códon 531 (n=3, 10,7%). Além disso, dois (7,1%) isolados apresentaram mutações tanto no códon 505 como no 526 (Tabela 9).

Tabela 9. Mutações na região determinante de resistência à rifampicina do gene *rpoB* identificadas por sequenciamento de Sanger nos 28 isolados de *M. tuberculosis* com mutações inferidas pelo teste GenoType MTBDR_{plus}

| Códon e tipo de mutação | Nº isolados | Proporção (%) | Perfil fenotípico | Associação com resistência à rifampicina/CIM** |
|---|--------------------|----------------------|---|---|
| 505 Phe>Leu (TTC>TTA) + 526 His>Asn (CAC>AAC) | 2 | 7,1 | MR | 505 Phe>Leu – Sem informação 526 His>Asn – Baixa/baixa |
| 513 Gln>Glu (CAA>GAA) | 1 | 3,6 | Pré-XDR | Sem informação |
| 516 Asp>Phe (GAC>TTC) | 1 | 3,6 | Poli | Alta/sem informação |
| 516 Asp>Ile (GAC>ATC) | 1 | 3,6 | MR | Sem informação |
| Deleção códon 518AAC | 2 | 7,1 | MR | Alta/sem informação |
| 522 Ser>Leu (TCG>TTG) | 1 | 3,6 | MR | Moderada/sem informação |
| 526 His>Leu (CAC>CTC) | 8 | 28,6 | 1 mono INH 4 poli 1 MR 2 pré-XDR | Alta/sem informação |
| 526 His>Asn (CAC>AAC) | 5 | 17,9 | Mono INH | Baixa/baixa |
| 526 His>Ser (CAC>TCC) | 1 | 3,6 | Poli | Sem informação |
| 531 Ser>Trp (TCG>TGG) | 3 | 10,7 | MR | Alta/alta |
| 533 Leu>Pro (CTG>CCG) | 1 | 3,6 | Poli | Moderada/moderada |
| Inferidas* | 2 | 7,1 | - | - |
| Total | 28 | 100 | - | - |

CIM: concentração inibitória mínima, MR: multirresistente, pré-XDR: pré-extensivamente resistente, poli: polirresistente (resistência à isoniazida e a mais outro(s) fármaco(s) de 1ª linha, exceto rifampicina), mono INH: monorresistente à isoniazida

* isolados não sequenciados, pois pertenciam a pacientes cujos outros isolados foram sequenciados no estudo

** Fontes: Miotto et al. (2017) e WHO (2018d)

Como descrito anteriormente, houve discordâncias entre os resultados fenotípicos de resistência à rifampicina e mutações no *rpoB*, sendo que entre os 159 isolados monorresistentes à isoniazida, sete apresentaram mutações neste gene, enquanto nove dos 46 isolados polirresistentes também apresentaram mutação (Tabela 10). Por sua vez, cinco dos 122 isolados MR não apresentaram mutação no *rpoB*.

Tabela 10. Tipos de mutação no gene *rpoB* identificados nos isolados de *M. tuberculosis* com resultados discordantes quanto à resistência fenotípica à rifampicina

| Tipo de mutação | Monorresistente à isoniazida | Polirresistente |
|-----------------------|------------------------------|-----------------|
| 526 His>Asn (CAC>AAC) | 5 | - |
| 526 His>Leu (CAC>CTC) | 1 | 5 |
| Inferida* | 1 | 1 |
| 526 His>Ser (CAC>TCC) | - | 1 |
| 516 Asp>Phe (GAC>TTC) | - | 1 |
| 533 Leu>Pro (CTG>CCG) | - | 1 |
| Total | 7 | 9 |

* isolados não sequenciados pois pertenciam a pacientes cujos outros isolados foram sequenciados no estudo

5.4. Associação entre mutações nos genes *katG* e *inhA* e níveis fenotípicos de resistência à isoniazida

Para a análise da associação entre os níveis de resistência à isoniazida e as mutações encontradas nos genes *katG* e *inhA* pela triagem por PCR em tempo real e pelo kit GenoType MTBDR*plus*, como também por sequenciamento de ambos os genes completos, foram incluídos os 367 isolados que se mostraram fenotipicamente resistentes após a repetição do teste de sensibilidade na concentração de 0,1 µg/mL de isoniazida (Tabela 11).

A mutação Ser315Thr no *katG* foi apresentada por 154 isolados, dos quais somente um (0,6%) demonstrou baixo nível de resistência, enquanto

151 (98,1%) tinham resistência intermediária e dois (1,3%) tinham alta resistência (Tabela 11).

Entre os 95 isolados com somente a mutação C-15T no promotor do *inhA*, 70 (73,7%) tiveram baixo nível de resistência, 21 (26,3%) apresentaram resistência intermediária (17 (17,9%) deles com CIM>1<3 µg/mL de isoniazida) e quatro (4,2%) tiveram alta resistência (Tabela 11).

Entre os 24 isolados com mutações tanto no *katG* como no *inhA*, 16 (66,6%) mostraram alto nível de resistência e oito (32,4%) possuíam resistência intermediária (sete (29,2%) deles com CIM>3<10 µg/mL de isoniazida). Todos os cinco isolados com as mutações Ser315Thr no *katG* e C-15T no *inhA* apresentaram alto nível de resistência, enquanto que cinco dos 10 isolados com as mutações Ser315Thr no *katG* e G-17T no *inhA* tiveram nível intermediário de resistência (CIM>3<10 µg/mL de isoniazida) e cinco tiveram alta resistência (Tabela 11).

Do total de 47 isolados sem mutação tanto no *katG* como no *inhA*, 28 (59,6%) apresentaram baixo nível de resistência, 12 (25,6%) tiveram resistência intermediária e sete (14,9%) alta resistência (Tabela 11).

Tabela 11. Mutações e níveis fenotípicos de resistência à isoniazida detectados nos 367 isolados de *M. tuberculosis* analisados

| Mutação | Nível de resistência à isoniazida | | | | | | | | Total |
|------------------------------------|-----------------------------------|-------------|----------------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------|------------------------|-------------|------------|
| | Baixo (CIM>0,1<1 µg/mL) | | Intermediário (CIM>1<3 µg/mL) | | Intermediário (CIM>3<10 µg/mL) | | Alto (CIM>10 µg/mL) | | |
| katG | | | | | | | | | |
| S315T | 1 | 0,6 | 52 | 33,8 | 99 | 64,3 | 2 | 1,3 | 154 |
| 315 outras | 1 | 16,7 | - | - | 1 | 16,7 | 4 | 66,7 | 6 |
| 1 mut | 9 | 31,0 | 5 | 17,2 | 4 | 13,8 | 11 | 37,9 | 29 |
| 2 mut | 3 | 33,3 | 3 | 33,3 | - | - | 3 | 33,3 | 9 |
| Total | 14 | 7,1 | 60 | 30,3 | 104 | 52,5 | 20 | 10,1 | 198 |
| inhA | | | | | | | | | |
| C-15T | 70 | 73,7 | 17 | 17,9 | 4 | 4,2 | 4 | 4,2 | 95 |
| S94A | 3 | 100 | - | - | - | - | - | - | 3 |
| Total | 73 | 74,5 | 17 | 17,3 | 4 | 4,1 | 4 | 4,1 | 98 |
| katG + inhA | | | | | | | | | |
| S315T + C-15T | - | - | - | - | - | - | 5 | 100 | 5 |
| S315T + G-17T | - | - | - | - | 5 | 50,0 | 5 | 50,0 | 10 |
| 315 outras + C-15T | - | - | 1 | 20,0 | - | - | 4 | 80,0 | 5 |
| Outras + C-15T | - | - | - | - | 2 | 66,7 | 1 | 33,3 | 3 |
| Outras + G76G | - | - | - | - | - | - | 1 | 100 | 1 |
| Total | - | - | 1 | 4,2 | 7 | 29,2 | 16 | 66,6 | 24 |
| katG + inhA sem mutação | 28 | 59,6 | 6 | 12,8 | 6 | 12,8 | 7 | 14,9 | 47 |
| Total | 115 | 31,3 | 84 | 22,9 | 121 | 33 | 47 | 12,8 | 367 |

S315T: mutação Ser315Thr

katG 315 ou inhA outras: mutações outras no katG 315 que não a S315T ou no inhA que não a substituição C-15T

katG 1 mut: isolado com uma mutação em outro códon do katG que não o 315

katG 2 mut: isolado com duas mutações em outros códons do katG que não o 315

5.5. Evolução da resistência fenotípica e genotípica

Dos 42 pacientes com mais de um isolado incluído no estudo, 23 (54,8%) tiveram isolados com alterações no perfil fenotípico e/ou genotípico de resistência aos fármacos, conforme descrito na Tabela 12.

O paciente 1 apresentou dois isolados MR em 2016 com níveis de resistência à isoniazida e perfis de mutação distintos. O primeiro isolado apresentou a mutação 315 Ser>Thr no *katG* e a mutação 531 Ser>Leu no

rpoB, enquanto o segundo isolado não apresentou mutação em nenhum dos genes analisados. Além disso, os perfis de RFLP de ambos os isolados deste paciente são diferentes.

O paciente 5 teve dois isolados polirresistentes analisados, sendo que o segundo apresentou um nível de resistência à isoniazida mais alto (apesar de continuar dentro da categoria intermediário) e a aquisição de uma mutação no gene *rpoB* (533 Leu>Pro) que não conferiu resistência à rifampicina. Os perfis de RFLP desses isolados foram iguais (SP 21a**), sendo que o primeiro isolado apresentou também outro perfil de bandas (perfil único, PU) juntamente com o perfil SP 21a**.

O paciente 6 teve 11 isolados incluídos no estudo, recebidos de 2013 a 2017, sendo os primeiros cinco (2013-2014) com baixa resistência e os seis restantes (2015-2017) com resistência intermediária. Dos três isolados recebidos em 2013, dois foram monorresistentes e um MR. Um dos isolados monorresistentes e o MR apresentaram as mesmas mutações no *katG* (300 Trp>Arg + 549 Cys>Gly). Além disso, o isolado MR apresentou a mutação no *rpoB* 516 Asp>Val juntamente com o genótipo selvagem (sem mutação). Dos oito isolados restantes, quatro apresentaram as mesmas mutações no *katG* que os isolados de 2013. Três desses quatro isolados apresentaram também a mutação 526 His>Asn no *rpoB*. Nenhum dos 11 isolados apresentou mutação no gene *inhA*. Dez dos 11 isolados deste paciente foram submetidos à tipagem molecular e todos apresentaram perfil com apenas duas bandas no RFLP-IS6110.

Os isolados referentes a 12 pacientes (7, 8, 9, 15, 20, 22, 25, 28, 30, 33, 35 e 42) tiveram alteração apenas nas concentrações inibitórias mínimas à isoniazida, sendo que os perfis de mutação e de RFLP permaneceram iguais, exceto para o paciente 38, cujo isolado do ano de 2017 adquiriu mutações nos códons 315 do *katG* e 531 do *rpoB*, mas apresentou o mesmo perfil de RFLP (PU) do isolado de 2016.

O paciente 12 teve quatro isolados com alta resistência, que apresentaram alternadamente mutações em três códons diferentes do *katG*

(315, 379 e 506), além da substituição C-15T no *inhA* e da mutação 531 Ser>Leu no *rpoB*. Todos os isolados tinham o mesmo perfil de RFLP.

O primeiro dos quatro isolados MR do paciente 24 tinha baixa resistência e apresentou somente a mutação 531 Ser>Leu no *rpoB*. Os três isolados posteriores apresentaram a mutação 259 Asp>Gly no *katG* e também a mutação 531 Ser>Leu no *rpoB*, além de todos apresentarem nível intermediário de resistência. O primeiro isolado apresentou ainda diferença de somente uma banda no RFLP (SP 5*) em comparação aos outros três isolados (SP 5).

O paciente 29 teve um isolado de 2015 MR com resistência intermediária e com as mutações C-15T no *inhA* e 531 Ser>Leu (juntamente com o genótipo selvagem) no *rpoB*. Em 2016, o segundo isolado deste paciente mostrou-se monorresistente com baixa resistência e não apresentou nenhuma mutação nos genes analisados. A tipagem molecular deste segundo isolado não foi realizada.

Entre os dois isolados MR com resistência intermediária de 2016 do paciente 34, o primeiro apresentou a mutação 315 Ser>Thr no *katG* e a mutação 531 Ser>Leu (juntamente com o genótipo selvagem) no *rpoB*. O segundo isolado apresentou uma mutação no *rpoB* a mais (531 Ser>Leu) em comparação ao primeiro isolado, além do genótipo de uma população selvagem para os três genes analisados.

O paciente 38 evoluiu de monorresistente para multirresistente: o primeiro isolado (2016) tinha resistência intermediária e não apresentava nenhuma mutação nos genes analisados, enquanto o segundo isolado (2017) apresentou mutações tanto no *katG* como no *rpoB* e permaneceu com o mesmo nível de resistência do isolado anterior. Ambos os isolados tinham perfis únicos de RFLP, os quais eram iguais entre si.

Também ocorreu evolução de monorresistente para MR no paciente 40: o primeiro isolado se mostrou sensível à isoniazida após a repetição do teste fenotípico quantitativo e não possuía nenhuma mutação nos genes analisados, e o segundo isolado apresentou alto nível de resistência e

mutações no *katG* e *rpoB*. Ambos os isolados possuíam o mesmo perfil de RFLP.

Por fim, o paciente 41 tinha inicialmente dois isolados MR com o mesmo perfil de RFLP e com mutações no *katG*, *inhA* e em dois códons diferentes do *rpoB*. Já o último isolado tinha um perfil de RFLP diferente dos anteriores e se mostrou polirresistente e sem nenhuma mutação no *rpoB*. Todos os isolados deste paciente foram altamente resistentes à isoniazida.

Tabela 12. Histórico das variações nos perfis fenotípicos e genotípicos de resistência dos isolados de *M. tuberculosis* de 23 pacientes

| Id paciente | Mês-ano entrada | Perfil resistência | CIM | | Mutação | Mutação | Mutação | Perfil RFLP |
|-------------|-----------------|--------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|-------------|--------------------|---------------|
| | | | isoniazida | Nível isoniazida | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | <i>rpoB</i> | |
| 1 | Jul-16 | MR | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 2c |
| | Dez-16 | MR | >0,1<1 | baixo | 315 mut(-) | prom mut(-) | mut(-) | SP 19j* |
| 5 | Jan-16 | poli | >1<3 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | mut(-) | SP 21a** + PU |
| | Ago-16 | poli | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 533 Leu>Pro | SP 21a** |
| 6 | Fev-13 | mono | >0,1<1 | baixo | 300 Trp>Arg+549 Cys>Gly | todo mut(-) | mut(-) | 2a |
| | Jul-13 | mono | >0,1<1 | baixo | 315 mut(-) | prom mut(-) | mut(-) | 2a |
| | Out-13 | MR | >0,1<1 | baixo | 300 Trp>Arg+549 Cys>Gly | todo mut(-) | 516 Asp>Val+mut(-) | NR |
| | Dez-14 | poli | >0,1<1 | baixo | 315 mut(-) | prom mut(-) | mut(+) | 2a |
| | Dez-14 | mono | >0,1<1 | baixo | 300 Trp>Arg+549 Cys>Gly | todo mut(-) | 526 His>Asn | 2a |
| | Jun-15 | mono | >1<3 | intermediário | 300 Trp>Arg+549 Cys>Gly | todo mut(-) | 526 His>Asn | 2a |
| | Ago-15 | mono | >1<3 | intermediário | 315 mut(-) | prom mut(-) | mut(+) | 2a |
| | Fev-16 | mono | >1<3 | intermediário | 300 Trp>Arg+549 Cys>Gly | todo mut(-) | 526 His>Asn | 2a |
| | Out-16 | mono | >1<3 | intermediário | 549 Cys>Gly | prom mut(-) | 526 His>Asn | 2a |
| | Fev-17 | mono | >1<3 | intermediário | 315 mut(-) | prom mut(-) | mut(-) | 2a |
| Jun-17 | mono | >1<3 | intermediário | 300 Trp>Arg+549 Cys>Gly | todo mut(-) | mut(-) | 2a | |
| 7 | Abr-15 | mono | <0,1 | <i>sensível</i> | 315 mut(-) | prom mut(-) | mut(-) | SP 7 |
| | Dez-15 | mono | <0,1 | <i>sensível</i> | todo mut(-) | todo mut(-) | mut(-) | SP 7 |
| | Jan-16 | mono | >0,1<1 | baixo | todo mut(-) | todo mut(-) | mut(-) | SP 7 |
| 8 | Mai-16 | MR | >10 | alto | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 2c |
| | Set-16 | MR | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 2c |

| | | | | | | | | |
|-----------|--------|---------|--------|---------------|-------------------------|-------------|--------------------|---------|
| | Jul-16 | MR | >3<10 | intermediário | todo mut(-) | C-15T | 531 Ser>Leu | SP 5ac* |
| | Out-16 | pré-XDR | >1<3 | intermediário | 315 mut(-) | C-15T | 531 Ser>Leu | NR |
| 9 | Dez-16 | MR | >1<3 | intermediário | 315 mut(-) | C-15T | 531 Ser>Leu | SP 5ac* |
| | Jan-16 | XDR | >10 | alto | 315 Ser>Asn+506 Ala>Thr | C-15T | 531 Ser>Leu | SP 49 |
| | Jul-16 | pré-XDR | >10 | alto | 379 Ala>Thr | C-15T | 531 Ser>Leu | SP 49 |
| | Dez-16 | pré-XDR | >10 | alto | 315 Ser>Asn+379 Ala>Thr | C-15T | 531 Ser>Leu | SP 49 |
| 12 | Jun-17 | XDR | >10 | alto | 315 Ser>Asn+506 Ala>Thr | C-15T | 531 Ser>Leu | SP 49 |
| | Set-15 | mono | >1<3 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | mut(-) | SP 1m* |
| 15 | Mai-16 | mono | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | mut(-) | SP 1m* |
| | Jan-09 | MR | >1<3 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 23 |
| | Mai-16 | XDR | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 23 |
| | Jan-17 | pré-XDR | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 23 |
| | Mai-17 | XDR | >1<3 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 23 |
| | Mai-17 | XDR | >1<3 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 23 |
| 20 | Mai-17 | pré-XDR | >1<3 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 23 |
| | Jun-16 | MR | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 4J |
| 22 | Jul-17 | pré-XDR | >1<3 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 4J |
| | Jun-16 | MR | >0,1<1 | baixo | todo mut(-) | todo mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 5* |
| | Out-16 | MR | >3<10 | intermediário | 259 Asp>Gly | todo mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 5 |
| | Mar-17 | MR | >3<10 | intermediário | 259 Asp>Gly | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 5 |
| 24 | Out-17 | MR | >1<3 | intermediário | 259 Asp>Gly | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 5 |
| | Out-16 | mono | >10 | alto | 232 Pro>Thr | todo mut(-) | mut(-) | SP 12~ |
| 25 | Ago-17 | mono | >0,1<1 | baixo | 232 Pro>Thr | todo mut(-) | mut(-) | SP 12~ |
| | Set-16 | MR | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 2c |
| 28 | Abr-17 | MR | >1<3 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 2c |
| | Jul-15 | MR | >3<10 | intermediário | todo mut(-) | C-15T | 531 Ser>Leu+mut(-) | SP 5 |
| 29 | Ago-16 | mono | >0,1<1 | baixo | todo mut(-) | todo mut(-) | mut(-) | NR |
| | Fev-09 | MR | >1<3 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 12 |
| 30 | Jan-16 | pré-XDR | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 12 |
| | Out-12 | poli | >1<3 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 526 His>Leu | SP 5e |
| 33 | Mai-16 | mono | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 526 His>Leu | SP 5e |
| | Jul-16 | MR | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 516 Asp>Val+mut(-) | SP 3f |
| 34 | Nov-16 | MR | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr+mut(-) | prom mut(-) | 516 Asp>Val+ | SP 3f |

| | | | | | | | | |
|-----------|--------|---------|-------|-----------------|--------------------|--------------|----------------------------|---------------|
| | Set-16 | pré-XDR | >3<10 | intermediário | todo mut(-) | C-15T | 531 Ser>Leu | SP 5 |
| | Abr-17 | pré-XDR | >1<3 | intermediário | 315 mut(-) | C-15T | 531 Ser>Leu | SP 5 |
| 35 | Set-17 | pré-XDR | >1<3 | intermediário | todo mut(-) | C-15T | 531 Ser>Leu | SP 5 |
| | Abr-16 | MR | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 2c |
| 37 | Ago-17 | pré-XDR | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | prom mut(-) | 531 Ser>Leu | SP 2c |
| | Mai-16 | mono | >3<10 | intermediário | todo mut(-) | todo mut(-) | mut(-) | PU |
| 38 | Nov-17 | MR | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Asn | prom mut(-) | 531 Ser>Trp | PU |
| | Mai-15 | mono | <0,1 | <i>sensível</i> | todo mut(-) | todo mut(-) | mut(-) | SP 11 |
| 40 | Mai-16 | MR | >10 | alto | 439 Gln>Arg | todo mut(-) | deleção códon 518 | SP 11 |
| | Jul-16 | MR | >10 | alto | 315 Ser>Thr | C-15T | 505 Phe>Leu+526 His>Asn | SP 30a |
| | Jun-17 | MR | >10 | alto | 315 Ser>Thr | C-15T | 505 Phe>Leu+526 His>Asn | SP 30a |
| 41 | Ago-17 | poli | >10 | alto | 315 Ser>Thr+mut(-) | C-15T+mut(-) | mut(-) | SP 2ga* + mix |
| | Ago-13 | poli | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | G-17T | 526 His>Leu | SP 10a |
| | Out-13 | pré-XDR | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | G-17T | 526 His>Leu | SP 10a |
| | Jun-14 | pré-XDR | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | G-17T | 526 His>Leu | SP 10a |
| | Dez-14 | poli | >3<10 | intermediário | 315 Ser>Thr | G-17T | 526 His>Leu | SP 10a* |
| 42 | Fev-16 | poli | >10 | alto | 315 Ser>Thr | G-17T | 526 His>Leu | SP 10a* |

CIM: concentração inibitória mínima, MR: multirresistente, poli: polirresistente (resistência à isoniazida e a outro(s) fármaco(s) de 1ª linha, exceto rifampicina), mono: monorresistente à isoniazida, pré-XDR: pré-extensivamente resistente, XDR: extensivamente resistente, *sensível*: isolado que se mostrou sensível à isoniazida na repetição do teste fenotípico, 315 mut(-): isolado sem mutação somente no códon 315 e que não teve todo o gene *katG* sequenciado, prom mut(-): isolado sem mutação somente na região promotora e que não teve todo o gene *inhA* sequenciado, todo mut(-): isolado que teve os genes *katG* e *inhA* inteiramente sequenciados e não apresentou mutação nesses genes, mut(+): isolado com mutação inferida e que não foi sequenciado, PU: perfil único de RFLP, *: uma banda de diferença em relação ao grupo genético relacionado (ex. o isolado com o perfil SP 19j* possui até uma banda de diferença em relação ao grupo SP19 j, **: duas bandas de diferença em relação ao grupo genético relacionado (ex. o isolado com o perfil SP 21a** possui até duas bandas de diferença em relação ao grupo SP 21a, ~: 3 bandas de diferença em relação ao grupo genético relacionado, NR: RFLP não realizado, mix: perfil de RFLP que sugere a existência de mais de um isolado em uma única amostra.

5.6. Análise da tipagem molecular dos isolados de *M. tuberculosis* por RFLP-IS6110

Para as análises dos perfis de RFLP dos isolados de *M. tuberculosis* e dos desfechos de tratamento (item 5.7), foi incluído apenas um isolado por paciente, considerando-se a data em que o isolado mais antigo do paciente deu entrada no NTM, totalizando 303 isolados correspondendo, então, a 303 pacientes. Destes, 19 (6,3%) não apresentaram crescimento em cultura e não puderam ser tipados, resultando em 284 (93,7%) isolados com resultados de tipagem por RFLP.

Dos 284 isolados tipados, 167 (58,8%) estavam em cluster, cinco (1,8%) apresentaram perfil com apenas duas bandas (2a), três (1%) apresentaram perfis sugestivos de culturas com mais de um isolado de *M. tuberculosis* (mix) e 109 (38,4%) apresentaram perfis únicos, ou seja, não estavam em cluster. Do total de 284 isolados, 73 (25,7%) pertenciam aos cinco clusters mais prevalentes, com mais de cinco isolados cada: SP 5 (n=36, 12,7%), SP 2c (n=13, 4,6%), SP 12 (n=10, 3,5%), SP 5ac (n=7, 1,8%) e SP 1i (n=7, 1,8%) (Tabela 13).

Ao se considerar para a definição de cluster não somente o perfil de bandas no RFLP como também os tipos de mutação encontrados ou não nos genes *katG*, *inhA* e *rpoB*, 126 dos 284 (44,4%) isolados tipados permaneceram em cluster, ou seja, além do mesmo perfil de RFLP eles apresentaram os mesmos tipos de mutação (Tabela 13).

Tabela 13. Perfis de RFLP-IS6110 dos isolados de *M. tuberculosis* de acordo com o período de recebimento no NTM

| Perfil | 2008-2009 (n=91) | | | 2016 (n=193) | | | Total (n=284) | | |
|---------|------------------|--------------------------------|-----------------|--------------|--------------------------------|-----------------|---------------|--------------------------------|-----------------|
| | N | n em cluster (RFLP+mutsção) | % em cluster | N | n em cluster (RFLP+mutsção) | % em cluster | N | n em cluster (RFLP+mutsção) | % em cluster |
| SP 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 100 | 3 | 2 | 66,7 |
| SP 1ak | 2 | 2 | 100 | - | - | - | 2 | 2 | 100 |
| SP 1g | 1 | 1 | 100 | 2 | 1 | 50 | 3 | 2 | 66,7 |
| SP 1i | 2 | 2 | 100 | 5 | 5 | 100 | 7 | 7 | 100 |
| SP 1m | 2 | 2 | 100 | 2 | 2 | 100 | 4 | 4 | 100 |
| SP 1o | 3 | 3 | 100 | 2 | 2 | 100 | 5 | 5 | 100 |
| SP 2c | 2 | 2 | 100 | 11 | 11 | 100 | 13 | 13 | 100 |
| SP 2ga | - | - | - | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| SP 2L10 | - | - | - | 4 | 2 | 50 | 4 | 2 | 50 |
| SP 3 | - | - | - | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| SP 3ah | - | - | - | 2 | 2 | 100 | 2 | 2 | 100 |
| SP 3ai | - | - | - | 3 | 3 | 100 | 3 | 3 | 100 |
| SP 3f | - | - | - | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| SP 3k | 2 | 0 | 0 | - | - | - | 2 | 0 | 0 |
| SP 4J | - | - | - | 2 | 2 | 100 | 2 | 2 | 100 |
| SP 4n1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| SP 5 | 7 | 7 | 100 | 29 | 26 | 89,7 | 36 | 33 | 91,7 |
| SP 5a | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| SP 5ab | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| SP 5ac | - | - | - | 7 | 7 | 100 | 7 | 7 | 100 |
| SP 5e | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| SP 5f | 1 | 1 | 100 | 2 | 2 | 100 | 3 | 3 | 100 |
| SP 5f4 | - | - | - | 2 | 2 | 100 | 2 | 2 | 100 |
| SP 6 | 1 | 0 | 0 | 3 | 2 | 66,7 | 4 | 2 | 50 |
| SP 7 | 2 | 2 | 100 | 3 | 3 | 100 | 5 | 5 | 100 |
| SP 10 | 1 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| SP 11 | 1 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| SP 12 | 2 | 2 | 100 | 8 | 8 | 100 | 10 | 10 | 100 |
| SP 12b | - | - | - | 2 | 2 | 100 | 2 | 2 | 100 |
| SP 12d | 3 | 3 | 100 | - | - | - | 3 | 3 | 100 |
| SP 16a | 1 | 1 | 100 | 2 | 2 | 100 | 3 | 3 | 100 |
| SP 21a | - | - | - | 4 | 4 | 100 | 4 | 4 | 100 |
| SP 23 | 2 | 2 | 100 | - | - | - | 2 | 2 | 100 |

| | | | | | | | | | |
|----------------------|-----------|-----------|-------------|------------|-----------|-------------|------------|------------|-------------|
| SP 23a | 1 | 1 | 100 | 1 | 1 | 100 | 2 | 2 | 100 |
| SP 26 | - | - | - | 2 | 2 | 100 | 2 | 2 | 100 |
| SP 30a | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| SP 41 | 2 | 2 | 100 | - | - | - | 2 | 2 | 100 |
| Total cluster | 44 | 33 | 75,0 | 123 | 93 | 75,6 | 167 | 126 | 75,4 |
| 2a* | 3 | - | - | 2 | - | - | 5 | - | - |
| Mix** | - | - | - | 3 | - | - | 3 | - | - |
| Perfil único | 44 | - | - | 65 | - | - | 109 | - | - |

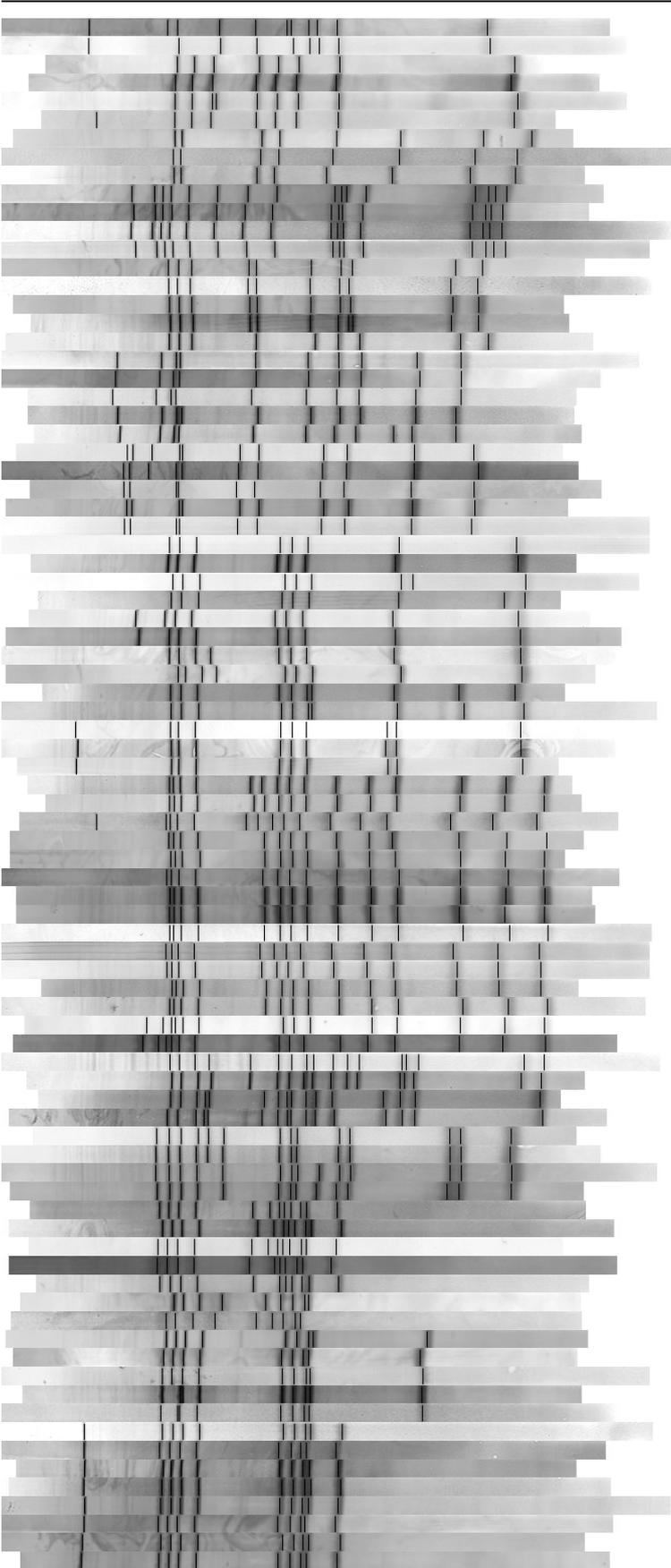
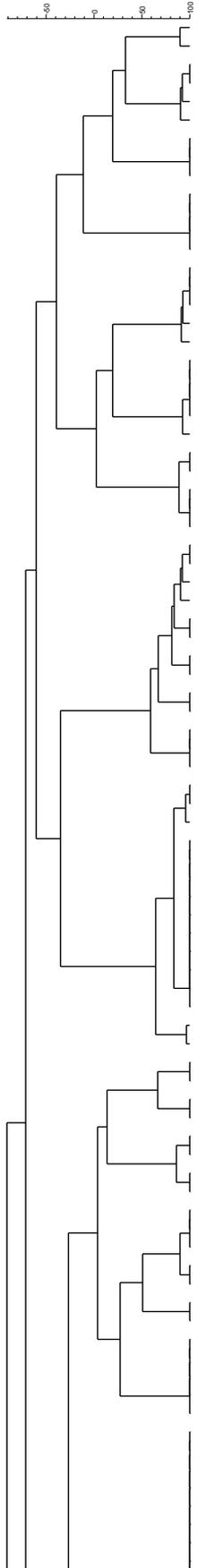
* Isolados com apenas duas bandas.

** Perfil de RFLP correspondente à presença de mais de um isolado na cultura.

A Figura 9 mostra os perfis de RFLP correspondentes aos 167 isolados encontrados em cluster.

IS6110 RFLP

IS6110 RFLP



| RFLP | Ano |
|--------|------|
| SP26 | 2016 |
| SP26* | 2016 |
| SP6 | 2016 |
| SP6* | 2016 |
| SP6* | 2008 |
| SP30a | 2016 |
| SP30a | 2016 |
| SP30a | 2008 |
| SP21a | 2016 |
| SP21a | 2016 |
| SP21a | 2016 |
| SP10 | 2016 |
| SP10 | 2016 |
| SP10 | 2016 |
| SP10* | 2016 |
| SP10* | 2009 |
| SP7 | 2016 |
| SP7 | 2008 |
| SP7 | 2009 |
| SP7* | 2016 |
| SP11* | 2008 |
| SP11* | 2016 |
| SP11 | 2016 |
| SP11 | 2016 |
| SP11 | 2016 |
| SP3 | 2016 |
| SP3 | 2016 |
| SP3* | 2016 |
| SP3* | 2016 |
| SP3f | 2016 |
| SP3f | 2016 |
| SP3ah | 2016 |
| SP3ah | 2016 |
| SP3k | 2009 |
| SP3k | 2009 |
| SP3ai | 2016 |
| SP3ai | 2016 |
| SP3ai | 2016 |
| SP12d | 2008 |
| SP12d | 2008 |
| SP12d* | 2008 |
| SP12 | 2016 |
| SP12 | 2008 |
| SP12 | 2009 |
| SP12b | 2016 |
| SP12b* | 2016 |
| SP4J | 2016 |
| SP4J | 2016 |
| SP4n1 | 2009 |
| SP4n1 | 2016 |
| SP23 | 2009 |
| SP23 | 2009 |
| SP23a | 2009 |
| SP23a | 2016 |
| SP5ab | 2016 |
| SP5ab | 2016 |
| SP5ab | 2008 |
| SP5a | 2016 |
| SP5a | 2008 |
| SP5e | 2016 |
| SP5e | 2009 |
| SP5f | 2016 |
| SP5f | 2016 |
| SP5f | 2009 |
| SP5f4 | 2016 |
| SP5f4 | 2016 |
| SP5 | 2016 |

Os tipos de mutação encontrados nos genes *katG* e *inhA* nos cinco clusters mais prevalentes estão descritos na Tabela 14. Dos 36 isolados que compõem o cluster SP 5, 22 (61,1%) eram monorresistentes, 11 (30,6%) MR e três (8,3%) pré-XDR. Entre os 36 isolados deste cluster, 33 (91,7%) tinham somente a mutação C-15T no *inhA*, sendo que 24 (72,7%) deles apresentaram baixo nível de resistência, seis (16,7%) eram intermediários e três (8,3%) tinham alta resistência à isoniazida.

Os 13 isolados do cluster SP 2c apresentaram todos a mutação Ser315Thr no *katG* (Tabela 14), sendo dois (15,4%) monorresistentes, 10 (76,9%) MR e um (7,7%) pré-XDR. Onze (84,6%) dos 13 isolados tinham resistência intermediária, sendo oito deles MR.

Todos os 10 isolados do cluster SP 12 também apresentaram a mutação Ser315Thr no *katG* (Tabela 14), sendo que sete (70%) eram MR e três (30%) pré-XDR. Todos os 10 isolados do cluster SP 12 apresentaram resistência intermediária à isoniazida.

Os sete isolados do cluster SP 5ac apresentaram a mutação C-15T no *inhA* (Tabela 14), sendo seis (85,7%) monorresistentes e um (14,3%) polirresistente. Todos os isolados apresentaram baixa resistência à isoniazida.

O cluster SP 1i continha sete isolados, todos também com a mutação Ser315Thr no *katG* (Tabela 14), dos quais cinco (71,4%) eram monorresistentes e dois (28,6%) MR. Todos os sete isolados apresentaram resistência intermediária.

Tabela 14. Mutações nos genes *katG* e *inhA* encontradas nos isolados de *M. tuberculosis* contidos nos cinco clusters mais prevalentes encontrados no estudo

| Mutação | Clusters | | | | | | | | | |
|--|----------------|------|-----------------|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|----------------|-----|
| | SP 5 (n=36) | | SP 2c (n=13) | | SP 12 (n=10) | | SP 5ac (n=7) | | SP 1i (n=7) | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| <i>katG</i> Ser315Thr | - | - | 13 | 100 | 10 | 100 | - | - | 7 | 100 |
| <i>inhA</i> C-15T | 33 | 91,7 | - | - | - | - | 7 | 100 | - | - |
| <i>katG</i> Ser315Gly+ <i>inhA</i> C-15T | 1 | 2,8 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>katG</i> Leu604Ser+ <i>inhA</i> C-15T | 1 | 2,8 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sem mutação | 1 | 2,8 | - | - | - | - | - | - | - | - |

Para a análise da relação entre os tipos de mutação e a distribuição dos isolados em cluster, foram excluídos da amostra cinco isolados com o perfil 2a (correspondente ao aparecimento de apenas duas bandas da IS6110) e três isolados com o perfil mix (sugestivo da presença de mais de um isolado na cultura), totalizando 276 isolados (Tabela 15).

Tabela 15. Relação entre mutações nos genes *katG* e *inhA* e distribuição em clusters dos 276 isolados de *M. tuberculosis* incluídos na análise

| Mutação | 2008-2009 | | | 2016 | | | Total | | | OR total ^c (95% IC) | P |
|--|-----------|----|------|------|-----|------|-------|-----|------|--------------------------------|-------|
| | N | n | % | N | n | % | N | n | % | | |
| <i>katG</i> 315 ^a | 47 | 23 | 48,9 | 76 | 52 | 68,4 | 123 | 75 | 61,0 | ref | ref |
| <i>katG</i> outras | 9 | 1 | 11,1 | 15 | 5 | 33,3 | 24 | 6 | 25,0 | 0,22 (0,07-0,62) | 0,002 |
| <i>inhA</i> C-15T | 17 | 12 | 70,6 | 59 | 49 | 83,1 | 76 | 61 | 80,3 | 2,59 (1,28-5,48) | 0,006 |
| <i>katG</i> + <i>inhA</i> ^b | 5 | 4 | 80,0 | 7 | 6 | 85,7 | 12 | 10 | 83,3 | 3,18 (0,64-31,1) | 0,22 |
| Sem mutação | 10 | 4 | 40,0 | 31 | 11 | 35,5 | 41 | 15 | 36,6 | 0,37 (0,17-0,81) | 0,01 |
| Total | 88 | 44 | 50,0 | 188 | 123 | 65,4 | 276 | 167 | 60,5 | - | - |

^a consideradas todas as mutações encontradas no códon 315 do gene *katG*

^b consideradas todas as mutações encontradas nos genes *katG* e *inhA*, incluindo as mutações no *katG* 315 e a mutação C-15T no *inhA*

^c considerados os valores totais de ambos os períodos constantes na terceira coluna da tabela para o cálculo; OR: *odds ratio* ou razão de chances

Os isolados com mutações no códon 315 do *katG* apresentaram-se com maior frequência em cluster (61%) quando comparados aos isolados com mutações em outros códons do *katG* (25%, $p= 0,002$), assim como quando comparados aos isolados sem mutação (36,6%, $p= 0,01$). Já os isolados com a mutação C-15T no *inhA* apresentaram-se com maior frequência em cluster quando comparados aos isolados com mutações no 315 do *katG* (80,3% vs 61%, $p= 0,006$) (Tabela 15).

5.7. Análise dos dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais, e dos desfechos de tratamento dos pacientes

Dos 303 pacientes incluídos no estudo, 142 (46,9%) apresentavam TB monorresistente à isoniazida, 40 (13,2%) TB polirresistente, 102 (33,7%) TB-MR, 11 (3,6%) TB pré-XDR e oito (2,6%) TB-XDR (Figura 10).

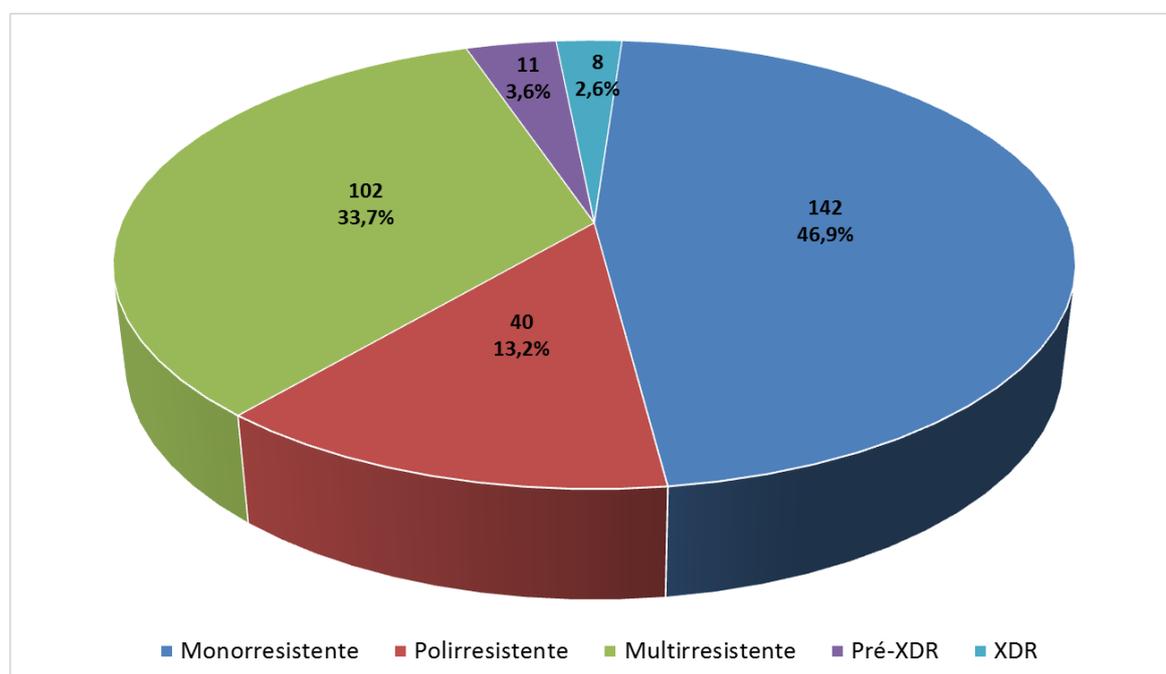


Figura 10. Perfil de resistência dos 303 isolados de *M. tuberculosis* correspondentes aos 303 pacientes incluídos no estudo

Entre os 303 pacientes incluídos no estudo, 299 (98,7%) foram notificados no sistema TB-WEB. Entre os quatro pacientes não notificados no sistema, um era do ano de 2008 e três de 2009.

Na Tabela 16 encontram-se os dados sociodemográficos e clínicos dos 299 pacientes notificados no sistema TB-WEB. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (n=232, 77,6%) e 284 (95%) apresentavam a forma pulmonar da doença. Do total de 299 pacientes, 157 (52,5%) eram casos novos de TB, dos quais 85 (54,1%) apresentavam TB monorresistente, 23 (14,6%) polirresistente, 44 (28%) MR, quatro (2,5%) pré-XDR e um (0,6%) XDR.

Tabela 16. Características sociodemográficas e clínicas dos 299 pacientes com tuberculose resistente notificados no sistema TB-WEB

| Dados sociodemográficos e clínicos | | |
|---|------------------------|----------------------|
| | Nº de pacientes | Proporção (%) |
| Sexo | | |
| Masculino | 232 | 77,6 |
| Feminino | 67 | 22,4 |
| Faixa etária (anos) | | |
| 16-25 | 45 | 15,1 |
| 26-35 | 72 | 24,1 |
| 36-45 | 76 | 25,4 |
| 46-55 | 67 | 22,4 |
| >55 | 39 | 13,0 |
| Raça | | |
| Amarelo | 1 | 0,3 |
| Branco | 109 | 36,5 |
| Pardo | 102 | 34,1 |
| Preto | 33 | 11,0 |
| Indígena | 1 | 0,3 |
| Não informado | 53 | 17,7 |

Instrução

| | | |
|---------------|-----|------|
| 1-3 anos | 28 | 9,4 |
| 4-7 anos | 105 | 35,1 |
| 8-11 anos | 79 | 26,4 |
| 12-14 anos | 11 | 3,7 |
| >15 anos | 2 | 0,7 |
| Não informado | 74 | 24,7 |

Forma clínica

| | | |
|------------------------|-----|------|
| Pulmonar | 284 | 95,0 |
| Extrapulmonar | 6 | 2,0 |
| Pulmonar+extrapulmonar | 9 | 3,0 |

Sorologia anti-HIV

| | | |
|-----------------------------|-----|------|
| Positiva | 36 | 12,0 |
| Negativa | 255 | 85,3 |
| Não informada/não realizada | 8 | 2,7 |

Tipo de caso no estudo

| | | |
|--------------------------------|------------------|------|
| Novo | 157 ^a | 52,5 |
| Recidiva | 59 ^b | 19,7 |
| Retratamento após falência | 30 | 10,0 |
| Retratamento após abandono | 52 | 17,4 |
| Retratamento após intolerância | 1 | 0,3 |

Fator de risco para TB^c

| | | |
|----------------------|-----|------|
| Uso de álcool | 108 | 36,1 |
| Uso de drogas | 79 | 26,4 |
| Diabetes | 41 | 13,7 |
| Privado de liberdade | 37 | 12,4 |
| Sem residência fixa | 22 | 7,4 |

^a 4 pacientes notificados mas o tratamento não foi iniciado

^b 1 paciente notificado mas o tratamento não foi iniciado

^c os fatores de risco foram contabilizados independentemente um do outro, ou seja, caso o paciente tivesse mais de um fator de risco, ele foi considerado mais de uma vez.

Na Tabela 17 estão descritas as mutações encontradas nos genes *katG* e *inhA* dos isolados correspondentes aos 299 pacientes notificados na TB-WEB, classificados em casos novos, recidiva e retratamento. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os casos novos, de recidiva e de retratamento com relação ao tipo de mutação encontrado.

Tabela 17. Mutações nos genes *katG* e *inhA* dos isolados de *M. tuberculosis* correspondentes aos 299 pacientes notificados, de acordo com o tipo de caso

| Mutação | Tipo de caso | | | | | |
|------------------|--------------|-------|----------|-------|--------------|-------|
| | Novo | | Recidiva | | Retratamento | |
| | n | % | n | % | n | % |
| <i>katG</i> | 76 | 48,4 | 28 | 47,5 | 51 | 61,4 |
| <i>inhA</i> | 47 | 29,9 | 20 | 33,9 | 18 | 21,7 |
| <i>katG+inhA</i> | 10 | 6,4 | 2 | 3,4 | 3 | 3,6 |
| Sem mutação | 24 | 15,3 | 9 | 15,2 | 11 | 13,3 |
| Total | 157 | 100,0 | 59 | 100,0 | 83 | 100,0 |

Ao se analisar a taxa de cura dos 299 pacientes notificados, divididos em casos novos e recidiva/retratamento, observou-se que os casos novos tiveram taxas de cura maiores do que os casos de recidiva/retratamento nos grupos de pacientes monorresistentes à isoniazida, polirresistentes, MR e pré-XDR (as diferenças não foram estatisticamente significantes dentro de cada grupo). Entre os pacientes XDR, o único caso novo não apresentou cura, enquanto um dos sete casos de recidiva/retratamento foi curado. Quando consideradas as taxas de cura totais para os casos novos e de recidiva/retratamento, a diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) (Tabela 18).

Tabela 18. Taxas de cura de acordo com o tipo de caso dos 299 pacientes com tuberculose resistente notificados

| Tipo de caso | Monorresistente | | | Polirresistente | | | Multirresistente | | | Pré-XDR | | | XDR | | | Total | | | P |
|-----------------------|-----------------|------|------|-----------------|------|------|------------------|------|------|---------|------|------|---------|------|------|---------|------|------|---------|
| | n total | cura | | n total | cura | | n total | cura | | n total | cura | | n total | cura | | n total | cura | | |
| | | n | % | | n | % | | n | % | | n | % | | n | % | | n | % | |
| Novo | 85 | 60 | 70,6 | 23 | 19 | 82,6 | 44 | 26 | 59,1 | 4 | 3 | 75,0 | 1 | 0 | 0,0 | 157 | 108 | 68,8 | <0,0001 |
| Recidiva+Retratamento | 56 | 30 | 53,6 | 17 | 9 | 52,9 | 55 | 22 | 40,0 | 7 | 3 | 42,9 | 7 | 1 | 14,3 | 142 | 65 | 45,8 | |
| Total | 141 | 90 | 63,8 | 40 | 28 | 70,0 | 99 | 48 | 48,5 | 11 | 6 | 54,5 | 8 | 1 | 12,5 | 299 | 173 | 57,9 | |

Considerando o total de 303 pacientes incluídos no estudo (299 notificados e quatro não notificados), 57,4% (n=174) dos pacientes apresentaram cura, seguidos por 12,9% (n=39) que abandonaram o tratamento e esta mesma porcentagem de pacientes foi à óbito. Falência de tratamento foi apresentada por 11,9% (n=36) dos 303 pacientes (Tabela 19).

Quando comparadas as taxas de cura entre os pacientes de acordo com a resistência fenotípica, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes com TB monorresistente e MR (64,1% vs 47,1%, p= 0,02), assim como entre os pacientes monorresistentes e com TB-XDR (63,4% vs 12,5%, p= 0,01). Os pacientes com TB polirresistente também apresentaram taxa de cura maior do que os pacientes com TB-MR (70% vs 47,1%, p= 0,02) e do que os pacientes com TB-XDR (12,5%, p= 0,004) (Tabela 19).

Tabela 19. Desfechos de tratamento dos 303 pacientes incluídos no estudo, de acordo com o perfil de resistência dos isolados de *M. tuberculosis*

| Desfecho | Monorresistente | | Polirresistente | | Multirresistente | | Pré-XDR | | XDR | | Total | |
|-------------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|------------------|--------------|-----------|--------------|----------|--------------|------------|--------------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Cura | 91 | 64,1 | 28 | 70,0 | 48 | 47,1 | 6 | 54,5 | 1 | 12,5 | 174 | 57,4 |
| Abandono | 18 | 12,7 | 5 | 12,5 | 14 | 13,7 | 1 | 9,1 | 1 | 12,5 | 39 | 12,9 |
| Falência | 9 | 6,3 | 2 | 5,0 | 20 | 19,6 | 1 | 9,1 | 4 | 50,0 | 36 | 11,9 |
| Óbito TB + não TB | 19 | 13,4 | 3 | 7,5 | 12 | 11,8 | 3 | 27,3 | 2 | 25,0 | 39 | 12,9 |
| Transferência | 2 | 1,4 | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 0,7 |
| Em andamento | 1 | 0,7 | 1 | 2,5 | 2 | 2,0 | - | - | - | - | 4 | 1,3 |
| Sem informação* | 1 | 0,7 | 1 | 2,5 | 3 | 2,9 | - | - | - | - | 5 | 1,6 |
| Não notificado | 1 | 0,7 | - | - | 3 | 2,9 | - | - | - | - | 4 | 1,3 |
| Total | 142 | 100,0 | 40 | 100,0 | 102 | 100,0 | 11 | 100,0 | 8 | 100,0 | 303 | 100,0 |

* pacientes notificados com a informação de “tratamento não iniciado” na TB-WEB

A Tabela 20 mostra os desfechos de tratamento dos 142 pacientes com TB monorresistente estudados, de acordo com o nível de resistência à isoniazida e com as mutações encontradas. A taxa de cura foi mais alta para

os pacientes cujos isolados possuíam mutações no *inhA* quando comparados àqueles que não tinham mutação (74,2% vs 50%, $p= 0,04$) e aos que tinham mutação apenas no *katG* (74,2% vs 66%, $p= 0,47$) (Tabela 20).

Dos 141 pacientes com TB monorresistente à isoniazida notificados, 64 (45,4%) tomaram o esquema básico para o tratamento, sendo 18 sem o etambutol (pacientes diagnosticados em 2008) e 46 com o etambutol. Destes 64 pacientes, 37 (57,8%) apresentaram cura. As mutações associadas à resistência à isoniazida encontradas nos isolados pertencentes a estes 37 pacientes constam na Tabela 21.

O esquema RZES (rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomicina) foi administrado a 51 pacientes com TB monorresistente, dos quais 42 (82,3%) apresentaram cura, enquanto que o esquema RZEOfl/Lev (rifampicina, pirazinamida, etambutol, ofloxacina/levofloxacina) foi dado a 11 pacientes, dos quais 7 (63,3%) curaram. Os demais pacientes receberam esquemas individualizados.

Tabela 20. Desfechos de tratamento dos pacientes com tuberculose monorresistente à isoniazida incluídos no estudo

| Desfecho (n total) | Nível de resistência à isoniazida | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-----------------------------------|-------------|----------|----------------------|-------------|------------------|----------|--------------|-------------|-----------|-----------------|---------------|-------------|------------------|-----------|
| | Alto (n=11) | | | Intermediário (n=48) | | | | Baixo (n=80) | | | Sensível (n=3)* | Total (n=142) | | | |
| | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | sem mut | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | <i>katG+inhA</i> | sem mut | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | sem mut | Sem mut | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | <i>katG+inhA</i> | sem mut |
| Cura (93) | 4 | - | 2 | 24 | 1 | - | 2 | 3 | 45 | 9 | 3 | 31 | 46 | - | 16 |
| Abandono (17) | - | 1 | - | 3 | 2 | 1 | - | 1 | 5 | 4 | - | 4 | 8 | 1 | 4 |
| Falência (8) | - | - | 1 | 1 | - | - | 1 | 1 | 1 | 3 | - | 2 | 1 | - | 5 |
| Óbito TB + não TB (19) | - | - | 2 | 9 | 1 | - | 2 | - | 5 | - | - | 9 | 6 | - | 4 |
| Transferência (2) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | - | - | - | - | 2 |
| Em andamento (1) | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - |
| Sem informação** (1) | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| Não notificado (1) | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| Total (142) | 5 | 1 | 5 | 37 | 4 | 1 | 6 | 5 | 57 | 18 | 3 | 47 | 62 | 1 | 32 |
| % cura*** | 80,0 | - | 40,0 | 64,9 | 25,0 | - | 33,3 | 60,0 | 78,9 | 50,0 | 100,0 | 66,0 | 74,2 | - | 50,0 |

* isolados sem mutação no *katG* e *inhA* e que se mostraram sensíveis à isoniazida após a repetição do teste de sensibilidade fenotípico

** paciente notificado com a informação de tratamento não iniciado na TB-WEB

***% cura = nº de pacientes que curaram/total de pacientes para cada tipo de mutação

Tabela 21. Mutações encontradas nos isolados de *M. tuberculosis* dos 37 pacientes com tuberculose monorresistente à isoniazida que foram tratados com o esquema I ou esquema básico e apresentaram cura

| Tipo de caso | Mutação | | | | | | Total |
|--------------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|-------|
| | <i>katG</i> | % | <i>inhA</i> | % | Sem mutação | % | |
| Novo | 8 | 33,3 | 12 | 50,0 | 4 | 16,7 | 24 |
| Recidiva | 1 | 12,5 | 6 | 75,0 | 1 | 12,5 | 8 |
| Retratamento | 2 | 40,0 | 3 | 60,0 | - | - | 5 |
| Total | 11 | 29,7 | 21 | 56,8 | 5 | 13,5 | 37 |

Quanto aos pacientes com TB polirresistente e TB-MR, as taxas de cura não diferiram significativamente entre os isolados com mutações no *katG*, no *inhA*, em ambos os genes e em nenhum dos genes (Tabela 22 e Tabela 23).

Entre os 40 pacientes com TB polirresistente notificados, 15 (37,5%) tomaram o esquema básico com ou sem etambutol, sendo que 9 (60%) apresentaram cura. Dois pacientes tomaram o esquema RZES, sendo que um curou. O esquema RZEOfl/Lev foi dado a 13 pacientes, dos quais 11 (84,6%) curaram. Os demais pacientes tomaram esquemas variados.

Entre os 99 pacientes com TB-MR notificados, os esquemas de tratamento mais frequentes foram ZESTLev (11/15 pacientes curaram, 73%), ZESEt (pirazinamida, etambutol, estreptomicina e etionamida) (3/12 pacientes curaram, 25%), ZETALev (pirazinamida, etambutol, terizidona, amicacina e levofloxacina) (7/9 pacientes curaram, 78%) e ZEEtCapLev (pirazinamida, etambutol, etionamida, capreomicina e levofloxacina (3/7 pacientes curaram, 43%).

Tabela 22. Desfechos de tratamento dos pacientes com tuberculose polirresistente incluídos no estudo

| Desfecho (n total) | Nível de resistência à isoniazida | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------|---------|----------------------|-------------|---------|-------------|-------------|---------|-----------------|--------------|-------------|------------------|---------|
| | Alto (n=6) | | | Intermediário (n=28) | | | Baixo (n=5) | | | Sensível (n=1)* | Total (n=40) | | | |
| | <i>katG</i> | <i>katG+inhA</i> | sem mut | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | sem mut | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | sem mut | sem mut | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | <i>katG+inhA</i> | sem mut |
| Cura (28) | - | 2 | - | 19 | 1 | 1 | 1 | - | 3 | 1 | 20 | 1 | 2 | 5 |
| Abandono (5) | - | - | 1 | 2 | - | 1 | - | 1 | - | - | 2 | 1 | - | 2 |
| Falência (2) | - | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - | 2 | - | - | - |
| Óbito TB + não TB (3) | 1 | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | 2 | - | 1 | - |
| Em andamento (1) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| Sem informação** (1) | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| Total (40) | 1 | 4 | 1 | 25 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 1 | 27 | 2 | 4 | 7 |
| % cura*** | - | 50,0 | - | 76,0 | 100,0 | 50,0 | 100,0 | - | 100,0 | 100,0 | 74,1 | 50,0 | 50,0 | 71,4 |

* isolados sem mutação no *katG* e *inhA* e que se mostraram sensíveis à isoniazida após a repetição do teste de sensibilidade fenotípico

** paciente notificado com a informação de tratamento não iniciado na TB-WEB

***% cura = nº de pacientes que curaram/total de pacientes para cada tipo de mutação

Tabela 23. Desfechos de tratamento dos pacientes com tuberculose multirresistente incluídos no estudo

| Desfecho (n total) | Nível de resistência à isoniazida | | | | | | | | | | | | Total (n=102) | | | |
|------------------------|-----------------------------------|-------------|------------------|---------|----------------------|-------------|------------------|---------|--------------|-------------|---------|-------------|---------------|------------------|---------|--|
| | Alto (n=20) | | | | Intermediário (n=67) | | | | Baixo (n=15) | | | | | | | |
| | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | <i>katG+inhA</i> | sem mut | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | <i>katG+inhA</i> | sem mut | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | sem mut | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | <i>katG+inhA</i> | sem mut | |
| Cura (49) | 6 | 1 | 2 | 1 | 30 | 1 | 3 | 1 | - | 4 | - | 36 | 6 | 5 | 2 | |
| Abandono (14) | 4 | - | - | - | 7 | 1 | - | - | 1 | 1 | - | 12 | 2 | - | - | |
| Falência (20) | 2 | 2 | 1 | - | 7 | 4 | - | - | 1 | 2 | 1 | 10 | 8 | 1 | 1 | |
| Óbito TB + não TB (12) | - | - | - | - | 7 | 2 | - | - | 1 | 1 | 1 | 8 | 3 | - | 1 | |
| Em andamento (2) | - | - | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 | - | 1 | - | |
| Sem informação* (3) | - | - | - | - | 2 | - | - | - | - | - | 1 | 2 | - | - | 1 | |
| Não notificado (2) | - | - | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - | 2 | - | - | - | |
| Total (102) | 12 | 3 | 4 | 1 | 56 | 8 | 3 | 1 | 3 | 8 | 3 | 71 | 19 | 7 | 5 | |
| % cura** | 50,0 | 33,3 | 50,0 | 100,0 | 53,6 | 12,5 | 100,0 | 100,0 | - | 50,0 | - | 50,7 | 31,6 | 71,4 | 40,0 | |

* tratamento não iniciado

** % cura = nº de pacientes que curaram/total de pacientes para cada tipo de mutação

As taxas de cura dos 11 pacientes com TB pré-XDR foram similares para os isolados com mutação no *katG* e no *inhA* (50% e 66,7%, respectivamente) (Tabela 24).

Entre os oito pacientes com TB-XDR, o único que apresentou cura tinha um isolado com mutação em ambos os genes (Tabela 25).

Tabela 24. Desfechos de tratamento dos pacientes com tuberculose pré-extensivamente resistente incluídos no estudo

| Desfecho (n total) | Nível de resistência à isoniazida | | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|----------------------|-------------|--------------|-------------|
| | Alto (n=1) | Intermediário (n=10) | | Total (n=11) | |
| | <i>katG</i> | <i>katG</i> | <i>inhA</i> | <i>katG</i> | <i>inhA</i> |
| Cura (6) | - | 4 | 2 | 4 | 2 |
| Abandono (1) | - | 1 | - | 1 | - |
| Falência (1) | - | - | 1 | - | 1 |
| Óbito TB + não TB (3) | 1 | 2 | - | 3 | - |
| Total (11) | 1 | 7 | 3 | 8 | 3 |
| % cura* | - | 57,1 | 66,7 | 50,0 | 66,7 |

* % cura = nº de pacientes que curaram/total de pacientes para cada tipo de mutação

Tabela 25. Desfechos de tratamento dos pacientes com tuberculose extensivamente resistente incluídos no estudo

| Desfecho (n total) | Nível de resistência à isoniazida | | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------|---------------------|-------------|------------------|
| | Alto (n=4) | | Intermediário (n=4) | Total (n=8) | |
| | <i>katG</i> | <i>katG+inhA</i> | <i>katG</i> | <i>katG</i> | <i>katG+inhA</i> |
| Cura (1) | - | 1 | - | - | 1 |
| Abandono (1) | - | - | 1 | 1 | - |
| Falência (4) | - | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Óbito TB + não TB (2) | 1 | - | 1 | 2 | - |
| Total (8) | 1 | 3 | 4 | 5 | 3 |
| % cura* | - | 33,3 | - | - | 33,3 |

* % cura = nº de pacientes que curaram/total de pacientes para cada tipo de mutação

Considerando os níveis de resistência à isoniazida para os grupos de pacientes com TB monorresistente, polirresistente e MR, houve diferença estatística entre as taxas de cura entre os isolados monorresistentes e MR com baixo nível de resistência (71,3% vs 28,6%, $p= 0,006$) . Houve também diferença estatística entre as taxas de cura de isolados com nível baixo e intermediário de resistência (71,3% vs 53,2%, $p= 0,04$) dentro do grupo de pacientes com TB monorresistente. Quando se consideram as taxas de cura totais, os pacientes cujos isolados tinham baixa resistência apresentaram taxa de cura maior do que os pacientes com isolados com alta resistência (65,7% vs 45,2%, $p= 0,04$) (Tabela 26). Os grupos pré-XDR e XDR não foram incluídos na análise devido à pequena quantidade de pacientes.

Tabela 26. Taxas de cura dos 295 pacientes notificados* de acordo com o nível de resistência à isoniazida dos isolados de *M. tuberculosis*

| Nível resistência isoniazida | Monorresistente | | | Polirresistente | | | Multirresistente | | | Pré-XDR | | | XDR | | | Total | | | P |
|------------------------------|-----------------|--------|--------|-----------------|--------|--------|------------------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|------|
| | N total | N cura | % cura | N total | N cura | % cura | N total | N cura | % cura | N total | N cura | % cura | N total | N cura | % cura | N total | N cura | % cura | |
| Alto | 11 | 6 | 54,5 | 6 | 2 | 33,3 | 20 | 10 | 50,0 | 1 | 0 | 0 | 4 | 1 | 25,0 | 42 | 19 | 45,2 | 0,06 |
| Intermediário | 47 | 25 | 53,2 | 28 | 21 | 75,0 | 65 | 34 | 52,3 | 10 | 6 | 60,0 | 4 | 0 | 0 | 154 | 86 | 55,8 | |
| Baixo | 80 | 57 | 71,3 | 5 | 4 | 80,0 | 14 | 4 | 28,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 99 | 65 | 65,7 | |
| Total | 138 | 87 | 63,8 | 39 | 27 | 69,2 | 99 | 48 | 48,5 | 11 | 6 | 54,5 | 8 | 1 | 12,5 | 295 | 169 | 57,6 | |

* não foram incluídos na análise os quatro isolados sensíveis à isoniazida após a repetição do teste fenotípico referentes a três pacientes com TB monorresistente e a um paciente com TB polirresistente

Quando foram consideradas as mutações encontradas nos genes *katG* e *inhA*, houve diferença estatística apenas entre as taxas de cura dos pacientes com isolados monorresistentes com mutação somente no *inhA* em comparação aos MR que também apresentaram mutação apenas neste gene (74,2% vs 27,8%, $p=0,001$) (Tabela 27).

Tabela 27. Taxas de cura dos 295 pacientes notificados* de acordo com as mutações encontradas nos genes *katG* e *inhA* nos isolados de *M. tuberculosis*

| Mutação | Monorresistente | | | Polirresistente | | | Multirresistente | | | Pré-XDR | | | XDR | | | Total | | | P |
|------------------|-----------------|--------|--------|-----------------|--------|--------|------------------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|------|
| | N total | N cura | % cura | N total | N cura | % cura | N total | N cura | % cura | N total | N cura | % cura | N total | N cura | % cura | N total | N cura | % cura | |
| <i>katG</i> | 47 | 29 | 61,7 | 27 | 20 | 74,1 | 69 | 36 | 52,2 | 8 | 4 | 50,0 | 5 | 0 | 0 | 156 | 89 | 57,1 | 0,45 |
| <i>inhA</i> | 62 | 46 | 74,2 | 2 | 1 | 50,0 | 18 | 5 | 27,8 | 3 | 2 | 66,7 | - | - | - | 85 | 54 | 63,5 | |
| <i>katG+inhA</i> | 1 | 0 | 0 | 4 | 2 | 50,0 | 7 | 5 | 71,4 | - | - | - | 3 | 1 | 33,3 | 15 | 8 | 53,3 | |
| Sem mutação | 28 | 13 | 46,4 | 6 | 4 | 71,4 | 5 | 2 | 40,0 | - | - | - | - | - | - | 39 | 19 | 48,7 | |
| Total | 138 | 87 | 63,0 | 39 | 27 | 69,2 | 99 | 48 | 48,5 | 11 | 6 | 54,5 | 8 | 1 | 12,5 | 295 | 169 | 57,3 | |

* não foram incluídos na análise os quatro isolados sensíveis à isoniazida após a repetição do teste fenotípico referentes a três pacientes com TB monorresistente e a um paciente com TB polirresistente

6. DISCUSSÃO

A TB resistente aos fármacos pode vir a se tornar a doença mais letal do mundo, responsável por 25% das mortes causadas por microrganismos com resistência antimicrobiana (Review on Antimicrobial Resistance, 2016). A partir de 2016, a OMS passou a recomendar um esquema de tratamento encurtado com duração de 9-12 meses para pacientes com TB-MR contendo isoniazida em altas doses, ou seja, o dobro da dosagem normalmente utilizada (Falzon et al., 2017).

Estudos demonstraram que a isoniazida em altas doses (16-18 mg/kg) pode ser seguramente utilizada sem o aumento do risco de toxicidade para os pacientes com TB-MR e XDR cujos isolados possuam baixo nível de resistência à isoniazida (Moulding 1981; Katiyar et al., 2008). Neste sentido, a detecção das mutações associadas a diferentes níveis de resistência à isoniazida pode fornecer subsídios para guiar a terapêutica mais apropriada ao paciente.

O presente estudo investigou as mutações nos principais genes relacionados à resistência à isoniazida, *katG* e *inhA*, e correlacionou-as com o nível fenotípico de resistência de 367 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida de pacientes do estado de São Paulo. A triagem inicial das mutações no códon 315 do gene *katG* e na região promotora do gene *inhA* pelos testes genotípicos de PCR em tempo real e sequenciamento, e pelo kit GenoType MTBDR*plus*, revelou mutações em 277 dos 367 isolados (75,5%), sendo que 90 (24,5%) não apresentaram mutação em nenhum dos dois alvos.

A mutação mais frequente encontrada no códon 315 do *katG* foi a substituição da serina pela treonina (Ser315Thr), que ocorreu em 95,5% (169/177) dos isolados com mutações neste códon. Com relação ao promotor do *inhA*, 91,5% (108/118) dos isolados com mutação nesta região tiveram a substituição C-15T. Ambos os tipos de mutação são os mais frequentes reportados mundialmente relacionados à resistência à isoniazida, corroborando nossos resultados (Zhang and Yew, 2009; Vilchèze and Jacobs Jr., 2014).

Outros tipos de mutação já descritos no códon 315 do gene *katG* também foram encontrados, como Ser315Asn, Ser315Arg e a deleção deste códon (Vilchèze and Jacobs Jr., 2014). Também foram observadas mutações em outros 32 códons do *katG*, além da presença de mais de uma mutação neste gene em um mesmo isolado. Esta grande variabilidade de mutações pode ser explicada pelo fato de que o gene *katG* está localizado em uma região altamente variável do genoma de *M. tuberculosis*. Como observado em nosso estudo, as mutações pontuais neste gene são mais frequentes do que as deleções (Unissa et al., 2016).

Quanto às mutações na região promotora do gene *inhA*, além da substituição C-15T, foi também observada a substituição G-17T, que ocorreu em 10 isolados sempre em conjunto com a mutação Ser315Thr no gene *katG*. Um estudo realizado na África do Sul encontrou a mutação G-17T em 83% dos isolados XDR (Müller et al., 2011). Em nosso estudo, 6/10 (60%) isolados com esta mutação eram polirresistentes, dois (20%) eram MR e dois (20%) eram pré-XDR.

Pelo fato de o *inhA* ser um gene essencial para o *M. tuberculosis*, a ocorrência de mutações em sua região codificante é rara (Vilchèze and Jacobs Jr., 2014). Neste estudo, foram observadas duas mutações diferentes na região codificante do *inhA*: três isolados com a mutação Ser94Ala e um com a mutação silenciosa Gly76Gly. Os três isolados com a mutação Ser94Ala tiveram baixo nível de resistência à isoniazida e não apresentaram mutação no *katG*. Já o isolado com a mutação Gly76Gly tinha duas mutações no *katG* (Arg463Leu e Ala478Arg) e alta resistência à isoniazida.

Morlock e col. (2003) identificaram a mutação Ser94Ala em três isolados com resistência intermediária à isoniazida, um deles apresentando somente esta mutação, o segundo apresentando também a mutação C-15T no *inhA* e o terceiro apresentando uma mutação no *katG*. Brossier e col. (2006) observaram a mutação Ser94Ala em sete isolados com baixo nível de resistência à isoniazida, sendo que quatro deles também tinham a mutação C-15T no *inhA* e os outros três tinham mutações no *katG*, incluindo a

Arg463Leu, também observada em nosso estudo. A mutação Arg463Leu é considerada um polimorfismo, por ser encontrada com mais frequência em isolados sensíveis à isoniazida ou juntamente com outras mutações no *katG* (Brossier et al., 2006; Vilchère and Jacobs Jr., 2014), como também foi observado neste trabalho.

Diversos estudos mostraram que a mutação Ser315Thr no *katG* aparece com mais frequência em isolados MR do que nos monorresistentes à isoniazida (Marttila et al., 1998; Hazbón et al., 2006). Neste estudo, a ocorrência desta mutação nos isolados polirresistentes, MR, pré-XDR e XDR foi maior do que nos isolados monorresistentes.

Considerando os níveis de resistência à isoniazida, mais da metade dos isolados analisados neste estudo (55,9%, n=205/367) apresentaram nível intermediário de resistência, sendo que 59% destes isolados tiveram CIM >3<10 µg/mL.

Quanto à relação entre as mutações e os níveis de resistência à isoniazida nos isolados estudados, 98,1% dos isolados com apenas a mutação Ser315Thr no *katG* tiveram resistência intermediária, proporção superior à de 82,7% encontrada por Lempens e col. (2018) para isolados com resistência intermediária (CIM≤3,2≤12,8 µg/mL em meio sólido de Lowenstein-Jensen). Somente um isolado com esta mutação apresentou baixo nível de resistência em nosso estudo, enquanto Lempens e col. (2018) não encontraram nenhum isolado com esta mutação e baixa resistência à isoniazida.

Mutações em diferentes regiões do gene *katG* também foram descritas em isolados resistentes à isoniazida por outros autores (Kandler et al., 2018; Lempens et al., 2018), as quais conferiram diferentes níveis de resistência, como encontrado em nosso estudo.

Neste trabalho, 73,7% dos isolados com a substituição C-15T no promotor do *inhA* apresentaram baixo nível de resistência à isoniazida, confirmando a associação entre mutações na região promotora do *inhA* e níveis baixos de resistência observada em outros estudos (Cambau et al., 2015; Lempens et al., 2018).

Mutações conjuntas nos genes *katG* e *inhA* foram encontradas em 24 isolados, sendo que 16 (66,6%) tinham alto nível de resistência à isoniazida. Lempens e col. (2018) também observaram uma maior frequência de mutações em ambos os genes em isolados com alta resistência.

Mesmo após o sequenciamento dos genes *katG* e *inhA* completos dos isolados que não tinham mutação no códon 315 do *katG* e no promotor do *inhA*, 47 (12,8%) dos 367 isolados fenotipicamente resistentes à isoniazida estudados continuaram sem apresentar mutações nesses genes. A resistência à isoniazida nestes isolados pode estar associada a mutações em outros genes, como os que regulam a expressão do *katG* (região intergênica *furA-katG* e *sigI*), além dos genes *ahpC*, *oxyR*, *kasA* e *ndh* e dos genes envolvidos nos mecanismos de bomba de efluxo (Vilchère and Jacobs Jr., 2014; Unissa et al., 2016).

Com relação à resistência à rifampicina, sabe-se que mais de 95% das mutações se encontram na RRDR de 81 pb do gene *rpoB* (Ramaswamy and Musser, 1998). Neste estudo, 157 dos 162 isolados fenotipicamente resistentes à rifampicina apresentaram mutações neste gene, ou seja, a detecção de mutações no *rpoB* apresentou 96,9% de sensibilidade. Por sua vez, 16 dos 212 isolados (7,5%) fenotipicamente sensíveis também apresentaram mutações, resultando em 92,5% de especificidade

A mutação mais frequente encontrada no *rpoB* foi a Ser531Leu, seguida por mutações nos códons 526, 516, 522, 505, 518 e 513. A mutação Ser531Leu é a mais frequentemente encontrada em isolados MR e causa altos níveis de resistência à rifampicina e rifabutina (Miotto et al., 2017). Dos 116 isolados com a mutação Ser531Leu encontrados no presente estudo, 89 (76,7%) eram MR, 21 (18,1%) pré-XDR e seis (5,2%) XDR.

Entre os 16 isolados fenotipicamente sensíveis à rifampicina que apresentaram mutações no *rpoB*, 12 apresentaram mutações diferentes no códon 526, um apresentou mutação no códon 533, um no códon 516 e dois não foram sequenciados. As mutações His526Leu e Asp516Phe, encontradas em um isolado monorresistente à isoniazida e em um isolado polirresistente, respectivamente, costumam conferir resistência fenotípica à

rifampicina, mas não à rifabutina. Por possuírem CIM próxima à concentração crítica testada fenotipicamente, podem ter resultado sensível à rifampicina, explicando os resultados encontrados. A mutação His526Asn, encontrada em cinco isolados monorresistentes à isoniazida, a His526Ser, encontrada em um isolado polirresistente e a Leu533Pro, também encontrada em um isolado polirresistente, não conferem resistência fenotípica à rifampicina e rifabutina, mas podem aumentar o risco de falência de tratamento ou recidiva, especialmente quando o isolado é resistente à isoniazida (Miotto et al., 2017).

Com relação aos 23 pacientes que tiveram mais de um isolado com variações fenotípicas e/ou genotípicas entre si incluídos no estudo, a tipagem molecular por RFLP revelou que os perfis de bandas se mantiveram os mesmos para os isolados de 21 desses pacientes. De maneira geral, os isolados de um mesmo paciente eram do mesmo ano ou tinham em média um ano de diferença entre si. No entanto, o mesmo perfil foi mantido por 10 dos 11 isolados do paciente 6, que deram entrada no NTM nos anos de 2013, 2014, 2015, 2016 e 2017, ou seja, possuíam até quatro anos de diferença. Todos os isolados deste paciente apresentaram somente duas bandas no RFLP, indicando que a infecção se manteve durante todos esses anos sendo causada pelo mesmo isolado.

Casos semelhantes em que o mesmo isolado se manteve durante um período mais longo de tempo ocorreram com o paciente 20, que teve um isolado do ano de 2009, um de 2016 e quatro de 2017, assim como o paciente 30 com um isolado de 2009 e outro de 2016, e com o paciente 33 (um isolado de 2012 e outro de 2016). O paciente 42 teve dois isolados de 2013, dois de 2014 e um de 2016, sendo que os quatro primeiros tinham o mesmo perfil de RFLP e os dois últimos apresentaram somente uma banda de diferença com relação aos anteriores. Alves e col. (2011) demonstraram que isolados de um mesmo paciente tinham perfis de MIRU-VNTR altamente relacionados, sugerindo que eles se originaram de um isolado comum e rejeitando a hipótese de ocorrência de reinfecção por outro isolado.

O paciente 1 apresentou dois isolados multirresistentes com diferentes perfis de RFLP e com apenas cinco meses de diferença entre as datas de entrada no laboratório. O segundo isolado não possuía mutação em nenhum dos genes, apesar de ser multirresistente no teste fenotípico. van Rie e col. (2005) também encontraram resultados discordantes entre o teste fenotípico e a análise dos genes associados à resistência à isoniazida e rifampicina em isolados de um mesmo paciente. Em três casos o teste fenotípico foi sensível e o isolado possuía mutação, enquanto que em outros dois casos a análise dos genes não revelou mutações em isolados fenotipicamente resistentes (van Rie et al., 2005).

Também foram observados alguns isolados com alterações nos perfis fenotípicos, passando de múltipla resistência para perfis menos resistentes (MR para monorresistente/polirresistente nos pacientes 6 e 29, por exemplo). A análise das mutações mostrou que os isolados MR de ambos os pacientes possuíam genótipos mutantes e selvagens para o gene *rpoB*. Resultados semelhantes foram obtidos por Alves e col. (2011), que observaram o mesmo perfil de MIRU-VNTR ou perfis bastante similares em isolados com variações fenotípicas. Esses autores afirmam que um mesmo isolado pode ter populações com diferentes perfis de resistência e somente um dos perfis acaba sendo detectado pelo teste fenotípico devido à seleção que ocorre pelo crescimento em cultura (Alves et al., 2011).

O paciente 41 apresentou isolados com perfis de RFLP diferentes entre si, apesar da diferença de somente um ano e alguns meses entre as datas de entrada no laboratório, sendo que o perfil de mutações destes isolados é concordante com seu perfil fenotípico. Braden e col. (2001) identificaram dois pacientes simultaneamente infectados com isolados com características genotípicas distintas. O paciente 1 tinha dois isolados provenientes de duas amostras de escarro coletadas com apenas 15 dias de diferença, com perfis de sensibilidade diferentes e perfis de RFLP com diferença de três bandas. O paciente 2 apresentou dois isolados distintos em uma mesma amostra de escarro, e a suspeita de contaminação cruzada foi descartada. Em amostras de escarro subsequentes deste paciente, apenas um ou outro tipo de isolado

foi detectado. Os autores afirmam que o ocorrido pode ser devido à diversidade de sítios pulmonares que o *M. tuberculosis* pode infectar, ou seja, um isolado habitava um sítio diferente do outro isolado. Para ambos os pacientes incluídos no estudo, não foi possível determinar se a infecção ocorreu simultaneamente ou não pelos dois isolados (Braden et al., 2001).

A análise por RFLP mostrou que 58,8% dos isolados estudados estavam em cluster, sugerindo a ocorrência de transmissão da TB resistente no estado de São Paulo. Cinco clusters foram mais prevalentes (SP 5, SP 2c, SP 12, SP 5ac e SP 1i), com mais de cinco isolados cada, e continham 25,7% de todos os isolados tipados. Os clusters SP 5 e SP 5ac estavam associados com a mutação C-15T no *inhA*, visto que 91,7% e 100% dos seus isolados, respectivamente, tinham esta mutação. Monorresistência foi demonstrada por respectivamente 61% e 85,7% dos isolados dos clusters SP 5 e SP 5ac, além de 66,7% e 100% dos isolados do SP 5 e SP 5ac, respectivamente, terem baixa resistência à isoniazida. Os clusters SP 2c, SP 12 e SP 1i estavam associados à mutação Ser315Thr no *katG* (100% dos isolados destes clusters tinham esta mutação), sendo que o SP 2c e o SP 12 eram compostos em sua maioria por isolados MR/pré-XDR (84,6% e 100%, respectivamente) com resistência intermediária à isoniazida (84,6% e 100%, respectivamente). Os isolados do cluster SP 1i, apesar de também possuírem a mutação Ser315Thr no *katG*, eram em sua maioria monorresistentes (85,7%), sendo que todos tinham resistência baixa à isoniazida.

Esses resultados mostram, mais uma vez, que a mutação C-15T no *inhA* está associada a um baixo nível de resistência à isoniazida, que ocorre com mais frequência em isolados monorresistentes, enquanto a mutação Ser315Thr no *katG* leva a níveis mais elevados de resistência e ocorre mais frequentemente em isolados MR. Resultados similares foram encontrados em estudos de transmissão da TB resistente de países como China e Argentina (Hu et al., 2010; Monteserin et al., 2017).

Quando analisada a relação entre as mutações no *katG* e *inhA* e a ocorrência dos isolados em cluster, observamos que isolados com a

mutação C-15T no *inhA* ocorreram mais frequentemente em cluster em comparação a mutações no códon 315 do *katG*. Por sua vez, isolados com mutações no 315 do *katG* ocorreram com maior frequência em cluster do que isolados com outras mutações no *katG* que não no 315, assim como do que os isolados sem mutação em ambos os genes.

Jagielski e col. (2015) sugeriram que os isolados com mutação no códon 315 do *katG* possuem baixa transmissibilidade, pois mais de dois terços dos casos de TB-MR por eles estudados que tinham esta mutação não estavam em cluster (Jagielski et al., 2015). Estudos realizados em São Francisco, EUA, e na Suíça encontraram tanto isolados com a mutação Ser315Thr no *katG* quanto isolados com a mutação C-15T no *inhA* ocorrendo em clusters (Gagneux et al., 2006; Fenner et al., 2012). Além disso, assim como neste estudo, não foi verificada associação entre outras mutações no *katG* que não a Ser315Thr com o aparecimento em cluster (Gagneux et al., 2006).

Em contrapartida, os estudos realizados na China e na Argentina observaram associação entre a mutação Ser315Thr no *katG* e o aparecimento em cluster, ao contrário da substituição C-15T no *inhA*, que não esteve associada à ocorrência em cluster (Hu et al., 2010; Monteserin et al., 2017).

A maioria dos pacientes com TB resistente incluídos no estudo possuía somente a forma pulmonar da doença (95%), era do sexo masculino (77,6%) e quase metade dos pacientes (44,5%) tinha grau de instrução de até sete anos. Estudos realizados no estado do Espírito Santo (Fregona et al., 2017) e no município de Santos, SP (Coelho et al., 2012), também encontraram predominância de TB em pacientes do sexo masculino (71% e 70,2%, respectivamente) e baixo grau de instrução, sendo que 39% e 41,4% dos pacientes estudados no Espírito Santo e em Santos, respectivamente, tinham grau de instrução de até oito anos. Resultados similares também foram encontrados para pacientes com TB resistente no Marrocos, onde 71,3% dos pacientes eram do sexo masculino e 49,5% estavam

desempregados, o que reflete as baixas condições socioeconômicas e o baixo nível de instrução dos pacientes (El Hamdouni et al., 2019).

Os isolados correspondentes aos casos de retratamento apresentaram mais mutações no gene *katG* e menos mutações no gene *inhA* quando comparados aos isolados dos casos novos e de recidiva; porém, as diferenças não foram estatisticamente significantes. Um estudo realizado na Índia também detectou maior proporção de mutações no *katG* e menor proporção de mutações no *inhA* em isolados de pacientes que haviam sido tratados previamente em comparação aos isolados de pacientes que nunca haviam sido tratados para TB (Alvarez-Uria and Reddy, 2018).

Wang e col. (2014) encontraram maiores taxas de desfecho de tratamento desfavorável em pacientes com TB monorresistente à isoniazida que haviam sido previamente tratados para TB em comparação aos casos novos (24,4% vs 10,8%) (Wang et al., 2014). Em nosso estudo, as taxas de cura também foram maiores entre os casos novos de TB quando comparados aos casos de recidiva e retratamento para todos os grupos estudados, exceto para o grupo de pacientes com TB-XDR, que apresentou somente um caso novo, o qual não evoluiu para cura.

Entre todos os pacientes com TB monorresistente à isoniazida incluídos no estudo, 63,4% apresentaram cura. Estudos que avaliaram os desfechos de tratamento de pacientes com TB monorresistente à isoniazida encontraram taxas de cura de 74% na Europa (Karo et al., 2019), de 78,3% na Tanzânia (Nagu et al., 2017) e de 83% em Taiwan (Chien et al., 2015). As diferenças encontradas entre as taxas de cura destes estudos podem ser explicadas pelos diferentes tipos de desenhos de estudo aplicados, assim como pela composição das populações estudadas quanto às características demográficas, sócio-econômicas e clínicas.

Neste estudo, a proporção de pacientes com TB monorresistente à isoniazida com desfechos desfavoráveis foi de 32,4%, sendo que 13,4% foram a óbito, 12,7% abandonaram o tratamento e 6,3% apresentaram falência. Desfechos de tratamento desfavoráveis foram encontrados em 21,6% dos pacientes com TB monorresistente à isoniazida na Tanzânia

(Nagu et al., 2017). A taxa de óbito (13%) foi similar à encontrada em nosso estudo, enquanto as taxas de falência e abandono (4,3% para ambos) foram menores do que as encontradas neste trabalho. Chien e col. (2015) encontraram uma taxa de 17% de desfechos desfavoráveis entre os pacientes com TB monorresistente à isoniazida, sendo óbito em 14,2% dos pacientes e falência em 2,8% (Chien et al., 2015). Na Europa, 15,7% dos pacientes com TB monorresistente à isoniazida apresentaram desfechos desfavoráveis, sendo que 6,8% foram a óbito, 1,4% apresentaram falência e 7,5% abandonaram o tratamento (Karo et al., 2019). A maior taxa de desfechos desfavoráveis encontrada para pacientes com TB monorresistente à isoniazida em nosso estudo em comparação a estes outros trabalhos pode ser um reflexo do uso do Esquema Básico ou do antigo Esquema I no tratamento de 45,4% destes pacientes, dos quais apenas 57,8% apresentaram cura.

No presente estudo, entre os pacientes com TB-MR, 47,1% apresentaram cura, 19,6% apresentaram falência, 13,7% abandonaram o tratamento e 11,8% foram a óbito. Um estudo realizado no Marrocos observou taxa de desfecho favorável semelhante à encontrada neste estudo (40,6%), enquanto 22,8% dos pacientes abandonaram o tratamento, 6,9% tiveram falência e 3% foram a óbito (El Hamdouni et al., 2019). Em um estudo que avaliou pacientes com TB-MR, pré-XDR e XDR do estado de São Paulo no período de 2011 a 2013, 71,6% dos pacientes com TB-MR apresentaram desfecho favorável e 17,4% foram a óbito (Gallo et al., 2018). A taxa de cura observada neste estudo para os pacientes com TB-MR foi bastante inferior à encontrada por Gallo e col. (2018). No presente estudo, 55 dos 102 (53,9%) pacientes com TB-MR eram do período de 2008-2009 e 47 (46,1%) de 2016. Dos 55 isolados de 2008-2009, apenas um foi submetido ao teste de sensibilidade aos fármacos de 2ª linha, com resultado sensível, enquanto o restante dos 54 isolados não foi submetido ao teste, pois este foi implantado na rotina do NTM apenas em 2012. Sendo assim, o diagnóstico de TB pré-XDR e XDR não foi realizado para 52,9% dos pacientes com TB-MR incluídos no estudo, o que implica na possibilidade de

estes pacientes terem sido tratados com fármacos de 2ª linha não efetivos, explicando, assim, a menor taxa de cura observada.

Quanto aos 11 pacientes com TB pré-XDR estudados, 54,5% apresentaram cura, 27,3% foram a óbito, 9,1% abandonaram o tratamento e 9,1% teve falência. Apenas 12,5% dos oito pacientes com TB-XDR estudados curaram, enquanto 20% dos pacientes tiveram falência, 25% foram a óbito e 12,5% abandonaram o tratamento. O estudo de Gallo e col. (2018) observou desfechos favoráveis para 54,5% e 48,4% dos pacientes com TB pré-XDR e XDR, respectivamente, enquanto 33,3% e 43,7% dos pacientes com TB pré-XDR e XDR, respectivamente, foram a óbito (Gallo et al., 2018). Os resultados de desfecho encontrados foram similares aos observados por Gallo e col. (2018) para os pacientes com TB pré-XDR. Em contrapartida, os pacientes com TB-XDR incluídos neste estudo apresentaram taxas de cura e óbito inferiores às encontradas por Gallo e col. (2018). Estes resultados podem ser explicados pela grande diferença entre o número de pacientes com TB-XDR analisados neste estudo (n=8) em comparação ao trabalho de Gallo e col. (2018) (n=32).

Entre os pacientes com TB monorresistente estudados, a taxa de cura para os pacientes com isolados com resistência baixa (71,3%) foi superior a dos pacientes com isolados com resistência intermediária (53,2%) e alta (54,5%). Outros estudos não detectaram relação entre sucesso de tratamento e nível de resistência à isoniazida em isolados monorresistentes a este fármaco (Bang et al., 2010; Chien et al., 2015; Romanowski et al., 2017; Wang et al., 2014). Chien e col. (2015) observaram taxas de desfecho favorável de tratamento similares entre pacientes com isolados com alto e baixo nível de resistência (82,2% vs 83,4%), assim como Romanowski e col. (2017), que detectaram sucesso de tratamento em 90,7% e 93,4% dos pacientes com isolados com alta e baixa resistência, respectivamente. Wang e col. (2014) observaram sucesso de tratamento para 86,7% dos pacientes com isolados com alta resistência e para 81,8% dos pacientes cujos isolados tinham baixa resistência à isoniazida. Quanto aos isolados com baixo nível de resistência à isoniazida estudados, a taxa de cura dos pacientes com TB-

MR (28,6%) foi estatisticamente menor do que a taxa de cura dos pacientes com TB monorresistente (71,3%) e polirresistente (80%).

Diferentemente dos estudos supracitados, que avaliaram níveis de resistência apenas em isolados monorresistentes à isoniazida (Bang et al., 2010; Chien et al., 2015; Romanowski et al., 2017; Wang et al., 2014), nosso trabalho também incluiu isolados polirresistentes, MR, pré-XDR e XDR. A menor taxa de cura encontrada para os pacientes com TB-MR com isolados com baixo nível de resistência em comparação aos pacientes com TB monorresistente e polirresistente encontrada neste estudo pode ser explicada pelo fato de que os pacientes com TB-MR são submetidos a tratamentos mais longos, geralmente com maiores taxas de abandono e falência, do que os pacientes com TB monorresistente à isoniazida e polirresistente, que são submetidos a tratamentos mais curtos com medicamentos mais toleráveis.

A ocorrência ou ausência de mutações nos genes *katG* e *inhA* também não pareceu estar associada às taxas de cura em nenhum dos grupos estudados, exceto nos pacientes com isolados monorresistentes com mutação no *inhA*, cuja taxa de cura foi estatisticamente maior do que nos pacientes com TB-MR. A maior taxa de cura apresentada pelos pacientes com TB monorresistente pode não estar diretamente relacionada à mutação no *inhA*, e sim ser consequência da grande complexidade de se realizar o tratamento de um paciente com TB-MR. Um estudo sobre pacientes com TB monorresistente à isoniazida realizado na Dinamarca não detectou nenhuma mutação associada com desfechos desfavoráveis (Bang et al., 2010). Em contrapartida, um estudo realizado no Vietnã observou que mutações no códon 315 do *katG* estavam associadas a desfechos de tratamento desfavoráveis como falência ou óbito e a recidivas, enquanto mutações no promotor do *inhA* estavam associadas com o risco de recidiva (Huyen et al., 2013).

Devido à complexidade do tratamento da TB resistente aos fármacos, especialmente da TB-MR, pré-XDR e XDR, existem alguns ensaios clínicos em andamento que visam melhorar o prognóstico do tratamento reduzindo a

sua duração e utilizando medicamentos novos, antigos ou reposicionados. Entre os ensaios clínicos que aplicam a isoniazida em altas doses estão o STREAM, NEXT e ACTG5312 (Silva et al., 2018).

O estudo STREAM (*The Evaluation of a Standard Treatment Regimen of Anti-tuberculosis Drugs for Patients With MDR-TB*), iniciado em 2016 e com previsão de término em 2021, tem como objetivo comparar a eficácia de dois esquemas de tratamento para TB-MR (um deles totalmente oral) utilizando a bedaquilina em comparação aos esquemas longo e encurtado de tratamento propostos pela OMS (ClinicalTrials.gov, 2019a).

O ensaio clínico NEXT (*Evaluating a New Treatment Regimen for Patients With Multidrug-resistant TB (MDR-TB) - a Prospective Open-label Randomised Controlled Trial*), previsto para finalizar em 2020, busca avaliar o impacto no tratamento da TB-MR de um esquema sem o uso de fármacos injetáveis com duração de seis a nove meses, composto por linezolida, bedaquilina, levofloxacina, pirazinamida e etionamida ou isoniazida em altas doses (de acordo com a existência ou não de mutação no *inhA*) (ClinicalTrials.gov, 2019b).

O estudo ACTG5312 (*The Early Bactericidal Activity of High-Dose or Standard-Dose Isoniazid Among Adult Participants With Isoniazid-Resistant or Drug-Sensitive Tuberculosis*) deve ser concluído em maio de 2020 e tem como objetivo utilizar diferentes doses de isoniazida em pacientes com TB resistente a este fármaco, a fim de se comparar a eficácia da isoniazida em altas doses nos pacientes com TB resistente com a eficácia da isoniazida em doses usuais nos pacientes com TB não resistente a este fármaco. Também serão avaliadas a segurança e tolerabilidade das diferentes doses de isoniazida utilizadas (ClinicalTrials.gov, 2019c).

O presente estudo possui algumas limitações. Quanto aos aspectos laboratoriais, não foram sequenciados os genes *katG* e *inhA* completos de todos os isolados, como também não foram investigadas mutações em outras regiões do genoma de *M. tuberculosis* conhecidas relacionadas à resistência à isoniazida. Também não foi realizada a determinação dos níveis fenotípicos de resistência à rifampicina, o que poderia complementar

as informações obtidas quanto às mutações encontradas no gene *rpoB*. Para a avaliação da associação entre os desfechos de tratamento e as mutações nos genes *katG* e *inhA*, assim como entre os desfechos de tratamento e os níveis de resistência à isoniazida, é necessária a realização de uma análise mais robusta que inclua diversos parâmetros, entre eles os esquemas de tratamento utilizados individualmente para cada paciente.

Tendo em vista a urgente necessidade da elaboração e padronização de esquemas de tratamento mais eficazes e toleráveis aos pacientes com TB resistente aos fármacos e à possibilidade da utilização da isoniazida em altas doses nestes esquemas, os achados do presente estudo podem colaborar para a possível implantação de esquemas de tratamento com altas doses de isoniazida para os pacientes do estado de São Paulo.

7. CONCLUSÕES

Entre os 367 isolados de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida incluídos no estudo, 75,5% apresentaram mutações no códon 315 do gene *katG* e/ou na região promotora do gene *inhA*. A mutação mais frequente encontrada no códon 315 do *katG* foi a substituição da serina pela treonina (Ser315Thr), que ocorreu em 95,5% dos isolados com mutações neste códon. Com relação ao promotor do *inhA*, 91,5% dos isolados com mutação nesta região tiveram a substituição C-15T.

O sequenciamento pela metodologia de Sanger dos genes *katG* e/ou *inhA* inteiros de 90 isolados sem mutações no códon 315 do *katG* e no promotor do *inhA* revelou a ocorrência de mutações em 43 (47,3%) isolados. Portanto, do total de 367 isolados fenotipicamente resistentes à isoniazida analisados, 47 (12,8%) não apresentaram mutações nos genes *katG* e/ou *inhA*, sugerindo que a resistência à isoniazida seja causada por alterações em outros alvos genéticos nestes isolados.

Dos isolados com mutações no gene *katG*, 82,8% apresentaram nível intermediário de resistência à isoniazida, enquanto que 73,7% dos isolados com a mutação C-15T no promotor do *inhA* apresentaram resistência baixa à isoniazida.

Entre os isolados com mutações conjuntas no *katG* e *inhA*, 95,8% apresentaram resistência intermediária (CIM >3<10 µg/mL) ou alta. Por sua vez, 59,6% dos isolados sem mutação em ambos os genes apresentaram baixo nível de resistência.

Mutações na RRDR do gene *rpoB* foram detectadas em 96,9% dos isolados fenotipicamente resistentes à rifampicina, sendo a mutação mais prevalente a substituição de serina para leucina no códon 531. Também foram encontradas mutações no *rpoB* em 7,5% dos isolados fenotipicamente sensíveis à rifampicina. Porém, estas mutações não estão associadas à resistência à rifampicina ou causam baixo nível de resistência, não sendo detectadas pelo teste fenotípico no meio líquido de MGIT.

A maioria (91,3%) dos pacientes que tiveram mais de um isolado incluído no estudo apresentou isolados com o mesmo perfil de bandas pela

metodologia de RFLP-IS6110, mostrando que estes pacientes permaneceram infectados pelo mesmo isolado durante o período de tratamento. Além disso, a análise por RFLP mostrou que 58,8% dos isolados incluídos no estudo estavam em cluster, evidenciando a ocorrência de transmissão da TB resistente no estado de São Paulo.

Foi observada a associação da mutação C-15T no promotor do *inhA* com a ocorrência dos isolados em cluster devido à predominância desta mutação nos isolados da família SP 5, a mais prevalente no estado de São Paulo. As mutações no códon 315 do *katG*, por sua vez, tiveram relação com o aparecimento dos isolados em cluster quando comparadas a outras mutações no *katG* que não no códon 315 e a isolados sem mutação em ambos os genes.

As taxas de cura foram mais elevadas para os pacientes com TB monorresistente e polirresistente em comparação aos pacientes com TB-MR, pré-XDR e XDR. De maneira geral, as taxas de falência e óbito foram maiores para os pacientes com TB-MR, pré-XDR e XDR em comparação aos pacientes com TB monorresistente e polirresistente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adami AG, Gallo JF, Pinhata JM, Martins MC, Giampaglia CM, Oliveira RS. Modified protocol for drug susceptibility testing of MGIT cultures of *Mycobacterium tuberculosis* by the MGIT 960. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; 87(2):108–11.

Alderwick LJ, Birch HL, Mishra AK, Eggeling L, Besra GS. Structure, function and biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall: arabinogalactan and lipoarabinomannan assembly with a view to discovering new drug targets. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(5):1325-8.

Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:1296–9.

Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:1417-30.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215:403-10. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

Alvarez-Uria G, Reddy R. Differences in *rpoB*, *katG* and *inhA* mutations between new and previously treated tuberculosis cases using the GenoType MTBDR*plus* assay. *Infect Genet Evol* 2018; 59:48-50.

Alves SLA, Metzker FS, Araújo-Filho JA, Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A. Clinical data and molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from drug-resistant tuberculosis patients in Goiás, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(6):655-61.

Ando H, Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Kato S, Mori T, Kirikae T. Downregulation of *katG* expression is associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2011; 9:1615–28.

Baker LV, Brown TJ, Maxwell O, Gibson AL, Fang Z, Yates MD, et al. Molecular analysis of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from England and Wales reveals the phylogenetic significance of the *ahpC*-46A polymorphism. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1455-64.

Bang D, Andersen PH, Andersen AB, Thomsen VØ. Isoniazid-resistant tuberculosis in Denmark: mutations, transmission and treatment outcome. *J Infect* 2010; 60(6):452-7.

Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med* 2003; 349(12):1149-56.

Barrera L. Chapter 3: The Basics of Clinical Bacteriology. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. *Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care*. *TuberculosisTextBook.com*; 2007. p. 93-112.

Bartholomay P, Pinheiro RS, Pelissari DM, Arakaki-Sanchez D, Dockhorn F, Rocha JL, et al. Sistema de Informação de Tratamentos Especiais de Tuberculose (SITE-TB): histórico, descrição e perspectivas. *Epidemiol Serv Saúde* 2019; 28(2):e2018158.

Böttger EC. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: molecular mechanisms and laboratory susceptibility testing. In: Donald PR, van Helden PD. *Progress in respiratory research*. Karger, Basel: 2011, p. 1-17.

Braden CR, Morlock GP, Woodley CL, Johnson KR, Colombel AC, Cave MD, et al. Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Infect Dis* 2001; 33(6):e42-7.

Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W. Performance of the Genotype MTBDR Line Probe Assay for Detection of Resistance to Rifampin and Isoniazid in Strains of *Mycobacterium tuberculosis* with Low- and High-Level Resistance. J Clin Microbiol 2006; 44(10):3659–64.

Brossier F, Sougakoff W, Aubry, Bernard C, Cambau E, Jarlier V, et al. Molecular detection methods of resistance to antituberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. Med Mal Infect 2017; 47(5):340-8.

Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. Nat Rev Microbiol 2015; 13(10):620-30.

Cambau E, Viveiros M, Machado D, Raskine L, Ritter C, Tortoli E, et al. Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European multicentre study. J Antimicrob Chemother 2015;70:686-96.

Caminero JA. Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis pulmonar. Rev Clin Esp 2016; 216(2):76–84.

Canetti G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1965; 92:687-703.

Cardoso RF, Cardoso MA, Leite CQ, Sato DN, Mamizuka EM, Hirata RDC, et al. Characterization of *ndh* gene of isoniazid resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102:59-61.

Chien JY, Chen YT, Wu SG, Lee JJ, Wang JY, Yu CJ. Treatment outcome of patients with isoniazid mono-resistant tuberculosis. Clin Microbiol Infect 2015; 21(1):59-68.

Chikaonda T, Ketseoglou I, Nguluwe N, Krysiak R, Thengolose I, Nyakwawa F, et al. Molecular characterisation of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Malawi. *Afr J Lab Med* 2017; 6(2):463.

Choi J-H, Lee KW, Kang H-R, Hwang YI, Jang S, Kim DG, et al. Clinical efficacy of direct DNA sequencing analysis on sputum specimens for early detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a clinical setting. *Chest* 2010; 137(2):393–400.

ClinicalTrials.gov. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2000. The Evaluation of a Standard Treatment Regimen of Antituberculosis Drugs for Patients With MDR-TB (STREAM); Identifier NCT02409290; Mar 12 2019. Disponível em: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02409290?term=NCT02409290&rank=1&show_desc=Y#desc. [acessado em 07 jan. 2020].

ClinicalTrials.gov. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2000. An Open-label RCT to Evaluate a New Treatment Regimen for Patients With Multi-drug Resistant Tuberculosis (NEXT); Identifier NCT02454205; Aug 19 2019a. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02454205>. [acessado em 07 jan. 2020].

ClinicalTrials.gov. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2000. High-Dose Isoniazid Among Adult Patients With Different Genetic Variants of INH-Resistant Tuberculosis (TB); Identifier NCT01936831; Nov 19 2019b. Disponível em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01936831>. [acessado em 07 jan. 2020].

Coelho AG, Zamarioli LA, Telles MA, Ferrazoli L, Waldman EA. A study of multidrug-resistant tuberculosis in risk groups in the city of Santos, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107(6):760-6.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. “Alexandre Vranjac”. Manual de utilização do TBWEB versão 1.6. São Paulo. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/tuberculose/manuais-tecnicos/dvtbc_tbweb_2008.pdf. [acessado em 09 set. 2019].

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. “Alexandre Vranjac”. Tuberculose no Estado de SP: Situação e desafios em tempos de crise. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/tuberculose/eventos/tb19_forum_laedisantoscomoestamos.pdf. [acessado em 26 dez. 2019]

Dalcolmo MP, Andrade MKN, Picon PD. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. Rev Saúde Pública 2007; 41(Suppl 1):34-42.

Dalcolmo MP. Tratamento da TB sensível e resistente. Pulmão RJ 2012; 21(1):55–9.

Daum LT, Rodriguez JD, Worthy SA, Ismail NA, Omar SV, Dreyer AW, et al. Next-generation Ion Torrent sequencing of drug resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 2012; 50(12):3831-7.

Dawson KL, Bell A, Kawakami RP, Coley K, Yates G, Collins DM. Transmission of *Mycobacterium orygis* (*M. tuberculosis* Complex Species) from a Tuberculosis Patient to a Dairy Cow in New Zealand. J Clin Microbiol 2012; 50:3136-8.

Dippenaar A, Parsons SDC, Sampson SL, van der Merwe RG, Drewe JA, Abdallah AM, et al. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium suricattae*. Tuberculosis (Edinb) 2015; 95(6):682-8.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2018. Stockholm: ECDC; 2018.

El-Hajj HH, Marras SA, Tyagi S, Shashkina E, Kamboj M, Kiehn TE, et al. Use of sloppy molecular beacon probes for identification of mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 2009;47(4):1190-8.

El Hamdouni M, Bourkadi JE, Benamor J, Hassar M, Cherrah Y, Ahid S. Treatment outcomes of drug resistant tuberculosis patients in Morocco: multi-centric prospective study. *BMC Infect Dis* 2019; 19(1):316.

Euzéby JP. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>. [acessado em 26 dez. 2019].

Falzon D, Schünemann HJ, Harausz E, González-Angulo L, Lienhardt C, Jaramillo E, et al. World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. *Eur Respir J* 2017; 49(3):1602308.

Fenner L, Egger M, Bodmer T, Altpeter E, Zwahlen M, Jaton K, et al. Effect of mutation and genetic background on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(6):3047-53.

Flandrois J-P, Lina G, Dumitrescu O. MUBII-TB-DB: a database of mutations associated with antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Bioinformatics* 2014; 15:107. Disponível em: <https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/mubii/mubii-select.cgi>

Fregona G, Cosme LB, Moreira CMM, Bussular JL, Dettoni VDV, Dalcolmo MP, et al. Risk factors associated with multidrug-resistant tuberculosis in Espírito Santo, Brazil. *Rev Saude Publica* 2017; 51(0):41.

Gagneux S, Burgos MV, DeRiemer K, Encisco A, Muñoz S, Hopewell PC, et al. Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog 2006; 2(6):e61.

Gallo JF, Pinhata JM, Chimara E, Gonçalves MG, Fukasawa LO, Oliveira RS. Performance of an in-house real-time polymerase chain reaction for identification of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in laboratory routine diagnosis from a high burden setting. Mem Inst Oswaldo Cruz 2016; 111(9):545-50.

Gallo JF, Pinhata JMW, Saraceni CP, Oliveira RS. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 system and the resazurin microtiter assay for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to second-line drugs. J Microbiol Methods 2017a; 139:168-71.

Gallo JF. Transmissão e prevalência de tuberculose extensivamente resistente entre pacientes com tuberculose multirresistente no estado de São Paulo no período de 2011 a 2013. [doutorado]. São Paulo: Programa de Pós-graduação em Ciências/CCD/SES; 2017b.

Gallo JF, Pinhata JMW, Simonsen V, Galesi VMN, Ferrazoli L, Oliveira RS. Prevalence, associated factors, outcomes and transmission of extensively drug-resistant tuberculosis among multidrug-resistant tuberculosis patients in São Paulo, Brazil: a cross-sectional study. Clin Microbiol Infect 2018; 24(8):889-95.

Giampaglia CM, de Brito AC, Martins MC, Ueki SY, Latrilha FO, de Oliveira RS, et al. Maintenance of *Mycobacterium tuberculosis* on glass beads. Ann Clin Lab Sci 2009; 39(1):51-4.

Gonçalves MG, Fukasawa LO, Oliveira RS, Salgado MM, Harrison LH, Shutt KA, et al. Fast test for assessing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by real-time PCR. Mem Inst Oswaldo Cruz 2012; 107:903-8.

Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. Front Microbiol 2018; 9:67.

Hain Lifescience GmbH. Instrução de uso do produto GenoType MTBDR*plus*. Hain Lifescience. Versão 2.0; 02/2012.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser 1999; 41:95-8.

Hazbón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(8):2640-9.

Hu Y, Hoffner S, Jiang W, Wang W, Xu B. Extensive transmission of isoniazid resistant *M. tuberculosis* and its association with increased multidrug-resistant TB in two rural counties of eastern China: a molecular epidemiological study. BMC Infect Dis 2010; 10:43.

Huyen MN, Cobelens FG, Buu TN, Lan NT, Dung NH, Kremer K, et al. Epidemiology of isoniazid resistance mutations and their effect on tuberculosis treatment outcomes. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(8):3620-7.

Jagielski T, Bakula Z, Roeske K, Kamiński M, Napiórkowska A, Augustynowicz-Kopeć E, et al. Mutation profiling for detection of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70(12):3214-21.

Kandler JL, Mercante AD, Dalton TL, Ezewudo MN, Cowan LS, Burns SP, et al. Validation of Novel *Mycobacterium tuberculosis* Isoniazid Resistance Mutations Not Detectable by Common Molecular Tests. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62(10).

Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a user guide. *J Appl Microbiol* 2003; 94(5):781-91.

Karo B, Kohlenberg A, Hollo V, Duarte R, Fiebig L, Jackson S, et al. Isoniazid (INH) mono-resistance and tuberculosis (TB) treatment success: analysis of European surveillance data, 2002 to 2014. *Euro Surveill* 2019; 24(12).

Katiyar S K, Bihari S, Prakash S, Mamtani M, Kulkarni H. A randomised controlled trial of high-dose isoniazid adjuvant therapy for multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12:139–45.

Kelley CL, Rouse DA, Morris SL. Analysis of *ahpC* gene mutations in isoniazid resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997; 41: 2057–8.

Kourout M, Chaoui I, Sabouni R, Lahlou O, El Mzibri M, Jordaan A, et al. Molecular characterisation of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Morocco. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13(11):1440–2.

Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martín C, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2607-18.

Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden BP. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology* 2015; 47:199–210.

Lawn SD, Nicol MP. Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future Microbiol* 2011; 6(9):1067–82.

Lempens P, Meehan CJ, Vandelannoote K, Fissette K, de Rijk P, Van Deun A, et al. Isoniazid resistance levels of *Mycobacterium tuberculosis* can largely be predicted by high-confidence resistance-conferring mutations. *Sci Rep* 2018; 8(1):3246.

Leung E, Ho P, Yuen K, Woo W, Lam T, Kao R, et al. Molecular characterization of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of a novel mutation in *inhA*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1075-8.

Machado D, Couto I, Perdigao J, Rodrigues L, Portugal I, Baptista P, et al. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 2012; 7:e34538.

Machado D, Perdigão J, Ramos J, Couto I, Portugal I, Ritter C, et al. High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa family is associated with *inhA* double mutations. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:1728-32.

Marttila HJ, Soini H, Eerola E, Vyshnevskaya E, Vyshnevskiy BI, Otten TF, et al. A Ser315Thr substitution in *KatG* is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(9):2443-5.

Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(4):658-85.

Migliori GB, Bothamley G, Duare R, Rendon A. Tuberculosis. *European Respiratory Society*; 2018.

Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção básica: Manual técnico para o controle da tuberculose. 6 ed. Brasília: Ministério da saúde, 2002.

Ministério da Saúde. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 3 ed. Edição comemorativa Rio de Janeiro; 2005.

Ministério da Saúde. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.

Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil – Versão 2; 2009.

Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde; 2019.

Miotto P, Tessema B, Tagliani E, Chindelevitch L, Starks AM, Emerson C, et al. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Eur Respir J 2017; 50(6).

Mitchison DA. What is drug resistance? Tubercle 1969; 50(Suppl):44-7.

Monteserin J, Paul R, Latini C, Simboli N, Yokobori N, Delfederico L, et al. Relation of *Mycobacterium tuberculosis* mutations at *katG315* and *inhA-15* with drug resistance profile, genetic background, and clustering in Argentina. Diagn Microbiol Infect Dis 2017; 89(3):197-201.

Morlock G, Metchock B, Sikes D, Crawford J, Cooksey R. *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:3799-805.

Moulding TS. Should isoniazid be used in retreatment of tuberculosis despite acquired isoniazid resistance? Am Rev Respir Dis 1981; 123:262-4.

Müller B, Streicher EM, Hoek KG, Tait M, Trollip A, Bosman ME, et al. *inhA* promoter mutations: a gateway to extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa? Int J Tuberc Lung Dis 2011;15(3):344-51.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Mycobacterium*. Trad. de CA Espanha et al. In: Microbiologia Médica. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora; 2006. p. 289-302.

Murray JF, Schraufnagel DE, Hopewell PC. Treatment of Tuberculosis. A Historical Perspective. *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12(12):1749-59.

Nagu TJ, Aboud S, Matee MI, Maeurer MJ, Fawzi WW, Mugusi F. Effects of isoniazid resistance on TB treatment outcomes under programmatic conditions in a high-TB and -HIV setting: a prospective multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72(3): 876-81.

Nguyen TNA, Anton-Le Berre V, Bañuls AL, Nguyen TVA. Molecular Diagnosis of Drug-Resistant Tuberculosis; A Literature Review. *Front Microbiol* 2019; 10:794.

Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 4(8):2720–2.

Parsons S, Smith SG, Martins Q, Horsnell WG, Gous TA, Streicher EM, et al. Pulmonary infection due to the dassie bacillus (*Mycobacterium tuberculosis* complex sp.) in a free-living dassie (rock hyrax-*Procavia capensis*) from South Africa. *Tuberculosis (Edinb)* 2008; 88(1):80-3.

Pfyffer GE. *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML and Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press; 2007. p. 543-572.

Portugal I, Maia S, Moniz-Pereira J. Discrimination of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 fingerprint subclusters by *rpoB* gene mutation analysis. *J Clin Microbiol* 1999; 37(9):3022-4.

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

Ramaswamy SV, Reich R, Dou Shu-Jun, Jasperse L, Pan X, Wanger A, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int Tuberc Lung Dis* 2003; 47:1241-50.

Rancoita PMV, Cugnata F, Gibertoni Cruz AL, Borroni E, Hoosdally SJ, Walker TM, et al. Validating a 14-drug microtiter plate containing bedaquiline and delamanid for large-scale research susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62:e00344-18.

Review on Antimicrobial Resistance. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016. Disponível em https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf [acessado em 01 nov. 2019].

Rinder H, Thomschke A, Rusch-Gerdes S, Bretzel G, Feldmann K, Rifai M, et al. Significance of *ahpC* promoter mutations for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17:508–11.

Rodrigues L, Machado D, Couto I, Amaral L, Viveiros M. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Inf Genet Evol* 2012; 12:695–700.

Romanowski K, Chiang LY, Roth DZ, Kraiden M, Tang P, Cook VJ, et al. Treatment outcomes for isoniazid-resistant tuberculosis under program conditions in British Columbia, Canada. *BMC Infect Dis* 2017; 17(1):604.

Rüsch-Gerdes S, Pfyffer GE, Casal M, Chadwick M, Siddiqi S. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials. *J Clin Microbiol* 2006; 44(3):688–92.

Schön T, Miotto P, Köser CU, Viveiros M, Böttger E, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. *Clin Microbiol Infect* 2017; 23:154–60.

Shikama ML, Farrapo ACX, Nogueira CF, Silva RFM, Sousa MS, Pini MIT, et al. Avaliação preliminar da suscetibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* à pirazinamida pela detecção da pirazinamidase. *Bol Inst Adolfo Lutz* 2002; 12(2):11.

Si J, Wang Z, Wang Z, Li H. Sequencing-based detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with spinal tuberculosis. *Arch Orthop Trauma Surg* 2012; 132(7):941–5.

Silva DR, Dalcolmo M, Tiberi S, Arbex MA, Munoz-Torrico M, Duarte R, et al. Novos fármacos e fármacos repropostos para o tratamento da tuberculose multirresistente e extensivamente resistente. *J Bras Pneumol* 2018; 44(2):153-60.

Soini H, Musser JM. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. *Clin Chem* 2001; 47:809-14.

Springer B, Lucke K, Calligaris-Maibach RC, Ritter C, Böttger EC. Quantitative drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by use of MGIT 960 and EpiCenter instrumentation. J Clin Microbiol 2009; 47:1773–80.

Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol 2001; 39:3563-71.

Tagliani E, Hassan MO, Waberi Y, De Filippo MR, Falzon D, Dean A, et al. Culture and next-generation sequencing-based drug susceptibility testing unveil high levels of drug-resistant-TB in Djibouti: results from the first national survey. Sci Rep 2017; 7:17672.

Tortoli E, Palomino JC. Chapter 14: New Diagnostic Methods. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care. TuberculosisTextBook.com; 2007. p. 441-486.

Unissa AN, Subbian S, Hanna LE, Selvakumar N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Genet Evol 2016; 45:474-92.

van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993; 31:406-9.

van Ingen J, Rahim Z, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, van Soolingen D. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. Emerg Infect Dis 2012; 18(4):653-5.

van Rie A, Victor TC, Richardson M, Johnson R, van der Spuy GD, Murray EJ, et al. Reinfection and mixed infection cause changing *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance patterns. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(5):636-42.

van Soolingen D, Hermans PW, Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and Stability of Insertion Sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Evaluation of an Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis. *J Clin Microb* 1991; 29(11):2578-86.

Velayati AA, Farnia P. Chapter 1 - The Species Concept. In: *Atlas of Mycobacterium tuberculosis*. Academic Press; 2017. p.1-16.

Vilchèze C, Jacobs WR Jr. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol Spectr* 2014; 2(4):MGM2-0014-2013.

Wang TY, Lin SM, Shie SS, Chou PC, Huang CD, Chung FT, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with low- and high-concentration isoniazid-mono-resistant tuberculosis. *PLoS One* 2014; 9(1):e86316.

Webber MA, Piddock LJ. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:9–11.

WHO. World Health Organization. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. Geneva; 2011.

WHO. World Health Organization. Treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. Geneva; 2016.

WHO. World Health Organization. Algoritmos de diagnóstico da TB segundo o modelo GLI. Global Laboratory Initiative Advancing TB Diagnosis. WHO – Genebra; 2017.

WHO. World Health Organization. Global tuberculosis report. Geneva; 2018a.

WHO. World Health Organization. WHO Treatment Guidelines for Isoniazid-Resistant Tuberculosis. Supplement to the WHO Treatment Guidelines for Drug-Resistant Tuberculosis. Geneva; 2018b.

WHO. World Health Organization. Technical Report on Critical Concentrations for Drug Susceptibility Testing of Medicines Used in the Treatment of Drug-resistant Tuberculosis. Geneva; 2018c.

WHO. World Health Organization. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide. Geneva; 2018d.

WHO. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva; 2019.

Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 2009; 13(11):1320-30.

Anexo. Parecer consubstanciado do CEPIAL

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação do nível de resistência a isoniazida em cepas de Mycobacterium tuberculosis e correlação com mutações nos genes que conferem resistência a este fármaco: katG e inhA.

Pesquisador: Rosângela Siqueira de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51700115.6.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.473.145

Apresentação do Projeto:

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa de distribuição universal e a segunda maior causa de morte devido a uma doença infecciosa, atrás apenas do HIV. O agente etiológico da TB é o Mycobacterium tuberculosis (MT) e a forma clínica mais comum é a pulmonar. A resistência às drogas preconizadas para o seu tratamento foi evidenciada a partir da década de 40, sendo um fenômeno que ocorre naturalmente, pelo mecanismo de mutação genética do MT, no seu processo de multiplicação, principalmente em ambientes com condições favoráveis de nutrição, oxigenação e pH, tal qual ocorre no interior da cavidade pulmonar. O tratamento básico de TB consiste em uma associação de fármacos, geralmente dividido em duas fases. A primeira fase é chamada de intensiva e a segunda fase chamada de manutenção. A fase intensiva tem duração de dois meses e são utilizados quatro fármacos: isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida. A fase de manutenção tem duração de quatro meses e são utilizados somente a isoniazida e a rifampicina. O teste de sensibilidade (TS) utilizado no tratamento da TB é uma ferramenta recomendada pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose para avaliar a resistência do MT frente aos fármacos, detectar a falência de tratamento e monitorar a resistência primária e/ou adquirida. A concentração final utilizada no TS para detectar resistência e/ou susceptibilidade à isoniazida é de 0,1 g/mL e a indicação de mudança do esquema de tratamento/fármaco é baseada neste

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3ª andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3058-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@lal.sp.gov.br

resultado. Vários grupos de pesquisadores publicaram artigos de estudos randomizados e controlados de pacientes tratados com altas doses de isoniazida e descreveram sucesso nos resultados de tratamento. Este projeto tem como objetivo padronizar o teste de sensibilidade à isoniazida em concentrações mais altas que 0,1 g/mL e comparar os níveis de resistência com as mutações nos genes que conferem resistência a este fármaco. Após esta padronização os pesquisadores pretendem, futuramente, propor o desenvolvimento de um projeto, com colaboração de ambulatorios e médicos que tratem de pacientes com tuberculose, para verificar se o tratamento com altas doses de isoniazida seria benéfico aos pacientes que estão tratando de TB resistente a este fármaco. Se o benefício for evidenciado haveria então um tratamento adicional, com um fármaco efetivo na eliminação do MT, mais tolerável e com menos efeitos colaterais que outros substitutos no tratamento de pacientes com resultados de isoniazida resistente.

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo Primário**

- Determinar o nível de resistência à isoniazida de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e correlacionar com os tipos de mutações nos genes *katG* e *inhA*.

Objetivos Secundários

- Testar os 120 isolados de MT resistentes à isoniazida nas concentrações de 1,0, 3,0 e 10,0 g/mL pelo método BACTEC MGIT 960 e padronizar este teste.
- Caracterizar o nível de resistência à isoniazida destas cepas.
- Realizar o sequenciamento dos genes *katG* e *inhA*.
- Analisar comparativamente os níveis de resistência e as mutações nesses genes.
- Realizar a tipagem molecular por RFLP dos isolados.
- Analisar o desfecho de cada caso de paciente com tuberculose isoniazida resistente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos**

Mínimos, relacionados às informações dos pacientes, uma vez tratar-se de pesquisa que utilizará cepas e análise de dados; e, principalmente, porque a pesquisadora responsável garante o sigilo de toda informação gerada na pesquisa.

Benefícios

A pesquisa está diretamente relacionada à melhoria do método laboratorial que determina o perfil de resistência a isoniazida em cepas de MT e a sua padronização em concentrações mais altas do

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3058-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepia@lal.sp.gov.br

fármaco. Este conhecimento e as demais informações referentes aos genes de resistência das cepas de MT estudadas são informações que poderão fundamentar futuras pesquisas sobre a possibilidade de um tratamento adicional com isoniazida em doses mais elevadas, uma vez ser um fármaco mais tolerável e com menos efeitos colaterais que aqueles que o substituem no tratamento de pacientes com MT isoniazida resistentes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de caráter relevante em saúde pública com possíveis aplicações futuras na melhoria do tratamento da tuberculose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados e de acordo, a seguir.

1. Folha de rosto

2. TCLE

A justificativa para dispensa do TCLE foi aceita.

Serão estudadas cepas bacterianas e os dados de humanos, cujos materiais biológicos lhes deram origem, dados estes disponíveis em fichas de notificação compulsória em sistema para o qual foi autorizado o acesso e, ainda, a pesquisadora responsável garante o sigilo sobre eles.

3. Termo de conhecimento da Resolução CNS 466/2012 - compromisso com o sigilo dos dados, assinado por Rosângela Siqueira de Oliveira, pesquisadora responsável, de 02/12/2015.

4. Autorização de acesso ao Sistema de Notificação e Acompanhamento dos Casos de Tuberculose – TB-WEB à pesquisadora responsável, por Ana Angélica Bulcão Portela Lindoso, médica infectologista, assinando por Vera Maria Neder Galesi, Coordenadora da Divisão de Tuberculose do Centro de Vigilância Epidemiológica/CCD/SES/SP, de 27/11/2015.

5. Autorização de acesso ao Sistema de Gerenciador de Ambiente Laboratorial do Ministério da Saúde à pesquisadora responsável, por Cláudia Patara Saraceni, Diretora da Unidade Integrada de Tecnologia de Informação e Comunicação do Instituto Adolfo Lutz (IAL), de 30/11/2015.

6. Termo de uso de isolados de amostras biológicas, assinado por Erica Chimara, Diretora do Núcleo de Tuberculose e Micobacteriose do IAL, de 02/12/2015.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: ceplai@lal.sp.gov.br

7. Declaração de compromisso de depósito de linhagens nas Coleções Biológicas do IAL, assinada por Rosângela Siqueira de Oliveira, pesquisadora responsável, de 04/12/2015.

8. Aprovação quanto ao mérito científico pelo Conselho Técnico Científico do IAL, corroborada pela diretoria geral da instituição, de 27/07/2015.

Recomendações:

Uma vez que a autorização quanto ao uso de login e senha que darão acesso aos dados das fichas de notificação dos pacientes foi dada nominalmente à pesquisadora responsável, e que somente ela firma o compromisso de sigilo, recomenda-se atentar a esta responsabilidade quanto à utilização da informação por qualquer outro membro da equipe de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo de pesquisa muito bem instruído, aprovado do ponto de vista ético, e coerente com as normas institucionais.

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL com base nas deliberações da reunião ordinária de 21 de janeiro de 2016.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

XI - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico

Continuação do Parecer: 1.473.145

integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|--------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_496735.pdf | 04/12/2015 19:11:19 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Isoniazida.pdf | 04/12/2015 19:08:41 | Rosângela Siqueira de Oliveira | Aceito |
| Outros | AprovacaoCTC.pdf | 04/12/2015 18:41:03 | Rosângela Siqueira de Oliveira | Aceito |
| Outros | Termo_conhecimento_resolucao_466_12.pdf | 04/12/2015 18:40:28 | Rosângela Siqueira de Oliveira | Aceito |
| Outros | Autorizacao_acesso_Sistema_GAL.pdf | 04/12/2015 18:38:12 | Rosângela Siqueira de Oliveira | Aceito |
| Outros | AutorizacaoTBWEB.pdf | 04/12/2015 18:32:10 | Rosângela Siqueira de Oliveira | Aceito |
| Outros | Declaracao_uso_Cepas.pdf | 04/12/2015 18:31:18 | Rosângela Siqueira de Oliveira | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | Declaracao_deposito_cepas.pdf | 04/12/2015 18:28:44 | Rosângela Siqueira de Oliveira | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaDeRosto_assinada.pdf | 04/12/2015 18:18:54 | Rosângela Siqueira de Oliveira | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 31 de Março de 2016

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
 Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3068-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@lal.sp.gov.br

