

WANEISSA TRINDADE CLEMENTE

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CEPAS DE
Mycobacterium tuberculosis RESISTENTES A DROGAS
ANTITUBERCULOSAS**

Hospital Júlia Kubitschek, Minas Gerais, 2001-2002

**Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2009**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Prof. Ronaldo Tadêu Pena

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^a. Elisabeth Ribeiro da Silva

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Francisco José Penna

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Carlos Faria Santos Amaral

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Prof. José Carlos Bruno da Silveira

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha (Coordenador)

Prof. Vandack Alencar Nobre Junior (Sub-coordenador)

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. José Roberto Lambertucci

Prof. Ricardo de Amorim Corrêa

Jader Bernardo Camponizzi (Discente Titular)

C626c Clemente, Wanessa Trindade.
Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de Mycobacterium tuberculosis resistentes a drogas antituberculosas [manuscrito]. / Wanessa Trindade Clemente. - - Belo Horizonte: 2009.
185f.: il.
Orientador: José Carlos Serufo.
Co-orientador: Moisés Palaci.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Tuberculose. 2. Tuberculose Resistente a Múltiplos Medicamentos. 3. Mycobacterium tuberculosis. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Serufo, José Carlos. II. Palaci, Moisés. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NLM: WF 200



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **WANESSA TRINDADE CLEMENTE**, nº de registro 2007652310. Às nove horas do dia vinte e cinco do mês de setembro de dois mil e nove, reuniu-se no Instituto Alfa do Hospital das Clínicas da UFMG, a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar o trabalho final intitulado: **"CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CEPAS DE Mycobacterium tuberculosis RESISTENTES ÀS DROGAS ANTITUBERCULOSAS Hospital Júlia Kubitschek, Minas Gerais, 2001-2002"**, requisito final para a obtenção do grau de Doutora em Medicina, área de concentração em Infectologia e Medicina Tropical, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Abrindo a sessão, o presidente da comissão, Prof. José Carlos Serufo, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. José Carlos Serufo/ Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Moises Palaci/coorientador	Instituição: UFES	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Ricardo de Amorim Corrêa	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Márcia Susana Nunes Silva	Instituição: ULBRA	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Paulo Pinto Gontijo Filho	Instituição: UFU	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA.
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 25 de setembro de 2009.

Prof. José Carlos Serufo / Orientador _____
Prof. Moises Palaci/Coorientador _____
Prof. Ricardo de Amorim Corrêa _____
Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari _____
Profa. Márcia Susana Nunes Silva _____
Prof. Paulo Pinto Gontijo Filho _____
Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha (Coordenador) _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.
Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde; Infectologia e Medicina Tropical
Faculdade de Medicina / UFMG

DEDICATÓRIA

Qualquer pequena obra tem uma estória que transcende a sua conclusão, pois começa lá atrás e só termina, não sei se termina...

Ao passado

À minha saudosa avó Raimunda, pela virtude de compreender sem julgar e pelo legado da maternidade que com candura e fé conduziu a família por 40 anos, dentre tantos percalços...

Ao meu pai morto e vivo intensamente em mim, pelo imenso amor que recebi capaz de durar uma vida inteira e também pelo exemplo de educador e pelo respeito à Universidade.

À minha mãe, que cada dia conheço e compreendo mais por ser agora mãe e mais próxima sempre.

Ao presente

Ao Nelson, cujo olhar me deu sentido, identidade e arrefeceu as minhas perdas, com sua alegria e vitalidade.

Ao futuro

À Hanna e ao Nicholas, que o milagre da vida descortine um belo caminho...

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Antes de mais nada, devo agradecer...

Aos meus orientadores, Prof. José Carlos Serufo e Prof. Moisés Palaci, capazes de combinar sabedoria e simplicidade, iluminando essa trajetória do início ao final, meu reconhecimento.

À Pós-graduação em Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, especialmente ao Coordenador Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ / RJ), Dr. Phillip Suffys e Dr. Harrison Magdinier Gomes.

Ao Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Laboratório Estadual do Rio Grande do Sul (LACEN - Porto Alegre/RS), Prof^a Maria Lúcia Rossetti, Dr^a Lia Possuelo, Dr^a Márcia Susana Nunes Silva, Dr^a Vivian Sumnienski Rodrigues, Dr^a Patrícia Izquierdo Cafrune e Dr^a Elis Dalla Costa.

Ao Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI - UFES) e Prof.. Reinaldo Dietze.

Ao Instituto Adolfo Lutz, Dr^a Maria Alice da Silva Telles e Dr^a Daisy Nakamura Sato.

Ao Departamento de Propedêutica Complementar, especialmente a Prof^a Elza Santiago Erichsen, Prof^a Silvana Maria Elói dos Santos, Prof. Edilberto Nogueira e a secretária Marília Aparecida de Souza.

Ao Serviço de Doenças Infecto-parasitárias (DIP - UFMG), Silvana Romano da Silva e Magda Nancy Aires dos Anjos.

Ao Hospital Júlia Kubitschek e o Serviço de arquivo médico, especialmente a Mislene dos Santos e Lourdes de Fátima.

Aos colegas da CCIH/HC e do Grupo de Transplante de Órgãos do Instituto Alfa de Gastroenterologia do HC/UFGM.

À Equipe de trabalho, *braccio destro*: Stella Sala Soares Lima e ao grupo de alunas, agora médicas: Ana Luiza Andrade Aragão, Ana Cristina Moreira, Clarice Santana e Fernanda Rodrigues de Almeida.

A toda minha família, especialmente à Grazie e Paulo Roberto, além dos amigos Soraya e Marcelo, pelo constante incentivo e leitura crítica. Ainda o apoio inquestionável de Dáuria de Oliveira e Vânia Márcia de Paula.

Assim, este estudo foi fruto do envolvimento pessoal e idealístico de vários, cujo esforço e colaboração permitiram sua realização.

Obrigada a todos!

"A vida só pode ser comprendida olhando-se para trás; mas só pode ser vivida olhando-se para frente."

(Soren Kierkegaard)

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

No contexto de crescente incidência de tuberculose (TB) e tuberculose multidroga resistente (TB-MDR), torna-se fundamental a detecção rápida da resistência, possibilitando tratamento eficaz e introdução de medidas para controle da disseminação. A caracterização de resistência às drogas antituberculosas (anti-TB), através de testes de sensibilidade e estudo molecular, ganhou importância durante as últimas décadas. Entretanto, sua disponibilidade está comprometida, principalmente em países em desenvolvimento. Este estudo caracterizou a resistência de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* do Estado de Minas Gerais (MG) às principais drogas anti-TB, comparando mutações genéticas, nível de resistência e dados clínico-epidemiológicos dos portadores.

Avaliaram-se dados clínico-epidemiológicos de 160 pacientes com TB presumida, atendidos no Hospital Júlia Kubitschek. Desses, selecionaram-se 76 amostras pulmonares de portadores de maior risco para desenvolvimento de TB resistente, que foram submetidas à avaliação da resistência às drogas anti-TB (isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomicina), através de: (a) teste de sensibilidade (TS) radiométrico qualitativo e quantitativo, com determinação da concentração inibitória mínima (CIM); (b) genotipagem pela análise do polimorfismo de sequências geradas pela digestão por endonucleases (RFLP); (c) sequenciamento do DNA dos principais genes associados à resistência a isoniazida, pirazinamida e etambutol (*katG*, *ahpC*, *inhA*, *pncA*, *embB*); e (d) hibridização reversa *PCR reverse line blot hybridization* para o gene associado à resistência a rifampicina (*rpoB*).

Das 76 amostras avaliadas pelo teste de sensibilidade, 24 (31,6 %) demonstraram resistência a pelo menos uma das drogas anti-TB testadas. Os portadores dessas cepas apresentaram maior frequência prévia de TB e exposição a drogas anti-TB. A resistência adquirida foi quatro vezes mais frequente que a resistência primária, sendo que 19 (79,0%) pacientes apresentaram exposição prévia a drogas e 4 (16,6%) não. Nenhuma das cepas resistentes apresentou padrão similar no RFLP,

fato que diminui a probabilidade de correlação epidemiológica entre elas. Das cepas resistentes, 87,5% (21/24) foram resistentes à isoniazida; 70,8% (17/24) à rifampicina; 54,2% (13/24) à estreptomicina; 43,5% (10/23) à pirazinamida e 41,7% (10/24) ao etambutol. A maior parte das cepas estudadas (17/24; 70,8%) foram MDR, considerando resistência combinada a rifampicina e isoniazida, e dessas apenas 40,0% (7/17) não apresentaram resistência adicional. Das 10 cepas multidroga resistente (MDR) (10/17; 59,0%) que apresentaram resistência combinada, oito apresentaram resistência ao etambutol e a estreptomicina. Cepas resistentes no TS qualitativo apresentaram níveis distintos de sensibilidade às drogas no teste quantitativo. O TS quantitativo não apresentou capacidade discriminatória para resistência à estreptomicina.

As cepas resistentes à isoniazida apresentaram mutações nos genes *katG* (75,0%) e *ahpC* (20,0%), e nenhuma mutação no gene *inhA*. Mutações no gene *rpoB* foram observadas em 78,6% dos isolados rifampicina resistentes. A detecção de mutação nos genes *katG* e *rpoB*, em combinação, identificou a maioria das cepas MDR (88,2%). Mutações do gene *pncA* foram identificadas em 62,5% das cepas pirazinamida resistentes. Quanto àquelas resistentes ao etambutol observaram-se mutações do *embB* em 71,4% das cepas.

Para essa amostragem, considerando a elevada frequência de resistência combinada, demonstra-se válida a realização de TS qualitativo e quantitativo para as drogas anti-TB, naqueles pacientes com suspeita de TB resistente. Em relação à análise genética observa-se que a detecção de portadores de cepas MDR seria eficaz em 88,2% dos casos, se utilizada pesquisa de mutação dos genes *katG* e *rpoB* em combinação, com resultado mais precoce que os testes convencionais e boa correlação com CIM elevada. A avaliação de mutações *embB* e *pncA* identifica apenas cerca de 60% a 70% das cepas resistentes ao etambutol e pirazinamida. A inatividade da pirazinamidase não é bom marcador de resistência, apesar de relacionado com CIM elevada para pirazinamida.

Assim, o uso de técnicas moleculares parece promissor na identificação rápida do portador de cepas resistentes, com conseqüente benefício clínico-epidemiológico. Entre 2000 a 2008 foram publicados nove estudos brasileiros que abordaram a avaliação molecular da tuberculose resistente. Esse estudo apresenta casuística expressiva dos casos de MDR notificados do Estado (cerca de 60%) para o período do estudo, sendo o primeiro que avalia seis mutações gênicas associadas às quatro principais drogas anti-TB em combinação, caracterizando a resistência em seus aspectos fenotípicos e genotípicos.

ABSTRACT

In the context of the growing incidence of tuberculosis (TB) and multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), the quick detection of resistance is vital, enabling effective treatment and the introduction of measures to control dissemination. The characterization of resistance to anti-tuberculosis drugs (anti-TB), by means of sensitivity tests and molecular studies, has gained importance over the last decades. However, its availability is compromised, especially in developing countries. This study depicted the resistance of strains of *M. tuberculosis* in the state of Minas Gerais to the main anti-TB drugs used, comparing genetic mutation, level of resistance, and patients clinical-epidemiological data.

Clinical-epidemiological data of 160 patients with presumed TB who had been seen at the Júlia Kubitschek Hospital were assessed. Of these, 76 pulmonary samples were selected from patients with a higher risk of developing resistant TB who were submitted to an evaluation of first-line anti-TB drugs (isoniazid, rifampicin, pyrazinamide, ethambutol, and streptomycin). This assessment was made by means of (a) radiometric qualitative and quantitative sensitivity testing (ST), with the determination of the minimal inhibitory concentration (MIC); (b) genotyping by analysis of the polymorphism of sequences generated by endonucleases digestion - *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP); (c) DNA sequencing of the primary genes linked to resistance (*katG*, *ahpC*, *inhA*, *pncA*, *embB*); and (d) *PCR reverse line blot hybridization*, a reverse hybridization assay for associated rifampicin resistance gene mutation (*rpoB*).

Of the 76 samples evaluated by the sensitivity test, 24 demonstrated resistance to at least one of the anti-TB drugs tested. Patients bearing these strains displayed a greater incidence of prior TB and exposure to anti-TB drugs. The acquired resistance was four times as frequent as the primary resistance; 19 (79.0%) patients had prior exposure to the drugs and 4 (16.6%) had not. None of the resistant strains showed similar RFLP patterns, a fact that diminished the epidemiological probability of epidemiological correlation among them. Of the

resistant strains, 87.5% (21/24) were resistant to isoniazid; 70.8% (17/24) to rifampicin; 54.2% (13/24) to streptomycin; 43.5% (10/23) to pyrazinamide, and 41.7% (10/24) to ethambutol. Most of the strains studied (17/24) were MDR, considering combined resistance to rifampicin and isoniazid, and about 40.0% (7/17) of these displayed no additional resistance. Of the 10 MDR strains that showed additional resistance, eight were resistant to ethambutol and to streptomycin. Resistant strains in the qualitative ST showed distinct levels of drug sensitivity in the quantitative test. The quantitative ST showed no discriminatory capacity for streptomycin resistance.

Strains resistant to isoniazid displayed mutations in genes *katG* (75.0%) and *ahpC* (20.0%), and no mutations in *inhA*. Mutations in gene *rpoB* were noted in 78.6% of rifampicin-resistant isolates. The detection of mutations in genes *katG* and *rpoB* combined, identified most of the MDR strains (88.2%). Mutations of the *pncA* gene were identified in 62.5% of the pyrazinamide-resistant strains. As to those resistant to ethambutol, mutations were observed in *embB* in 71.4% of the strains.

For this sampling, considering the high frequency of combined resistance, the performance of qualitative and quantitative ST proved to be valid for first-line anti-TB drugs in patients with suspected TB resistance. As to genetic analysis, we noted that the detection of patients with MDR strains in Minas Gerais would be effective in 88.2% of cases, if research of the combined mutation of genes *katG* and *rpoB* were used, furnishing earlier results than with conventional testing and a good level of correlation with an elevated MIC. Assessment of mutations in *embB* and *pncA* only identified about 60% to 70% of the strains resistant to ethambutol and pyrazinamide. Inactivity of pyrazinamidase is not a good indicator of resistance, in spite of being related to a high MIC for pyrazinamide.

Thus, the use of molecular techniques seems promising for rapid identification of patients with resistant strains, with consequent clinical-epidemiological benefits.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação do mecanismo de ação da isoniazida	57
FIGURA 2 - Polimorfismo detectado na proteína <i>katG</i> , identificada em cepas de <i>M. tuberculosis</i> , resistentes à isoniazida.	59
FIGURA 3 - Representação esquemática da região intergênica <i>oxyR-ahpC</i> de <i>M. tuberculosis</i>	60
FIGURA 4 - Representação esquemática de mutações identificadas no locus <i>inhA</i> de cepas de <i>M. tuberculosis</i> resistentes à isoniazida e etionamida.....	62
FIGURA 5 - Desenho esquemático com estrutura terciária da proteína do <i>inhA</i> , apresentando substituições de aminoácidos, identificadas em cepas de <i>M. tuberculosis</i> resistentes à isoniazida.....	62
FIGURA 6 - Mutações descritas no gene <i>rpoB</i> de cepas de <i>M. tuberculosis</i> resistentes à rifampicina.....	65
FIGURA 7 - Desenho esquemático do mecanismo de ação da pirazinamida em <i>M. tuberculosis</i>	67
FIGURA 8 - Desenho esquemático do mecanismo de ação do etambutol em <i>M. tuberculosis</i>	69
FIGURA 9 - Seleção de pacientes e amostras	77
FIGURA 10 - Processamento da amostra.....	83
FIGURA 11 - Avaliação fenotípica e genotípica das cepas de <i>M. tuberculosis</i>	84
FIGURA 12 - Mapa físico da sequência de IS6110 de <i>M. tuberculosis</i>	87
FIGURA 13 - Epidemiologia Molecular / <i>Fingerprinting</i> (RFLP).....	88
FIGURA 14 - Distribuição geográfica dos 24 pacientes portadores de cepas resistentes na região metropolitana de Belo Horizonte.....	95

FIGURA 15 - Autoradiografia de membrana de transferência do <i>Southern blot</i>	104
--	-----

FIGURA 16 - Autoradiografia do <i>rifoligotyping</i> com identificação de mutação do <i>rpoB</i> no códon 531 e em códon específico não detectado (CEND).....	109
---	-----

LISTAS

TABELAS

QUADROS

FIGURAS

ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Taxa de incidência de casos novos de tuberculose, no período de 2000 a 2002, no Estado de Minas Gerais.....	40
TABELA 2 - Estratificação do teste de sensibilidade por método radiométrico.....	86
TABELA 3 Características clínico-epidemiológicas dos 24 pacientes portadores de cepas resistentes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , Hospital Júlia Kubitschek, janeiro de 2001 a janeiro de 2002.....	94
TABELA 4 - Número de diagnósticos prévios de TB pulmonar nos 24 pacientes com TB pulmonar resistente.....	97
TABELA 5 - Evolução clínica dos 19 pacientes portadores de cepas resistentes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> com história de tuberculose pulmonar prévia e submetidos a tratamento anterior.....	97
TABELA 6 - Teste de sensibilidade qualitativo às drogas anti-TB.....	98
TABELA 7 - Avaliação combinada de testes de sensibilidade a drogas: perfil de cepas de <i>M. tuberculosis</i> resistentes à isoniazida e/ou rifampicina testados em relação a outras drogas.....	99
TABELA 8 - Distribuição estratificada dos testes de sensibilidade quantitativos	100
TABELA 9 - Distribuição das 24 cepas em relação ao teste de sensibilidade e uso prévio de droga anti-TB.....	101
TABELA 10 - Avaliação do teste de sensibilidade às drogas anti-TB de acordo com a evolução clínica.....	103
TABELA 11 - Mutações do gene <i>katG</i> associadas à resistência à isoniazida.....	106
TABELA 12 - Avaliação comparativa entre teste de sensibilidade qualitativo e quantitativo para isoniazida e mutação do gene <i>katG</i>	106
TABELA 13 - Mutações do gene <i>ahpC</i> associadas à resistência à isoniazida	107

TABELA 14 - Avaliação comparativa entre o teste de sensibilidade qualitativo e quantitativo para isoniazida e mutação do gene <i>ahpC</i>	108
TABELA 15 Mutações detectadas no gene <i>rpoB</i>	109
TABELA 16 - Avaliação comparativa entre teste de sensibilidade qualitativo e quantitativo para rifampicina e mutação do gene <i>rpoB</i>	110
TABELA 17 Mutações detectadas nos isolados resistentes à pirazinamida.....	110
TABELA 18 - Avaliação comparativa entre teste de sensibilidade qualitativo e quantitativo para pirazinamida e mutação do gene <i>pncA</i>	111
TABELA 19 - Correlação da mutação do gene <i>pncA</i> e atividade de pirazinamidase para cepas resistentes à pirazinamida.....	112
TABELA 20 Relação entre atividade de pirazinamidase e teste de sensibilidade quantitativo da pirazinamida.....	112
TABELA 21 Mutações de <i>embB</i> detectadas nos isolados resistentes ao Etambutol	113
TABELA 22 Avaliação comparativa entre TS, CIM e mutação <i>embB</i>	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Amicacina
<i>ahpC</i>	<i>Gene que codifica a enzima alquil-hidroperóxido redutase</i>
Anti-TB	Antituberculose
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
C	Citosina
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América)
CDCT	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CEND	Códon específico não detectado
CENEPI	Centro Nacional de Epidemiologia
Cfz	Clofazimina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CO ₂	Dióxido de carbono
CTAB	Brometo de Cetiltrimetamônio
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DOTS	<i>Direct Observed Therapy Strategy</i>
E	Etambutol
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Enzima imunoensaio)
<i>embB</i>	Gene que codifica a arabinosiltransferase
<i>embCAB</i>	Operon que codifica a arabinosiltransferase
Et	Etionamida
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
G	Guanina
H	Isoniazida
H37Rv	Cepa de <i>M. tuberculosis</i> de referência seqüenciada em 1998
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HIV/TB	Coinfectado pelo vírus HIV e <i>M. tuberculosis</i>
HJK	Hospital Julia Kubitschek
<i>inhA</i>	Gene que codifica a enoil-ACP redutase
IS6110	Sequência repetitiva de DNA no genoma do <i>M. tuberculosis</i>
IUATLD	União Internacional contra Tuberculose e outras doenças pulmonares

<i>kasA</i>	Gene que codifica a enzima beta cetoacil-ACP sintase
<i>katG</i>	Gene que codifica a enzima catalase-peroxidase
<i>kda</i>	Unidade Kilodalton
LACEN	Laboratório Central
LJ	Lowenstein-Jensen
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MG	Minas Gerais
µg	Micrograma
Mm	Micrometro
MDR	Multidroga resistente
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídio forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio forma reduzida
NAP	p-nitro-α-acetilamino-β-hidroxipropiofenona
<i>ndh</i>	Gene que codifica a NADH desidrogenase
NDI	Núcleo de Doenças Infecciosas
Ofl	Ofloxacina
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>oxyR</i>	Gene regulador
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR aparelho	<i>Programmable Thermal Controller</i>
pH	Potencial de hidrogênio
<i>pncA</i>	Gene que codifica a enzima pirazinamidase
<i>Pvu</i> II	Enzima de restrição - endonuclease
PZase	Pirazinamidase
QT	Quimioterapia
R	Rifampicina
RDR	Região determinante de resistência
REDE-TB	Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucléico
<i>rpoB</i>	Gene que codifica a RNA polimerase
<i>rpsL</i>	Gene associado à resistência à estreptomicina
S	Estreptomicina
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SES	Secretaria Estadual de Saúde

SIDA	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
SSCP	Polimorfismo conformacional de fragmentos de fita simples
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multidroga resistente
TRIS	Trishidroximetil
Trz	Terizidona
TS	Teste de sensibilidade
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultra-violeta
Z	Pirazinamida

LISTA DE AMINOÁCIDOS

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

ÍNDICE

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	31
2	REVISÃO DE LITERATURA	34
2.1	Principais aspectos da doença.....	34
2.2	Tratamento da tuberculose	35
2.3	Epidemiologia da TB	37
2.4	Epidemiologia molecular	41
2.5	Tuberculose resistente às drogas anti-TB	42
2.6	O bacilo <i>M. tuberculosis</i>	48
2.7	Mecanismos moleculares associados à resistência	49
2.8	Testes para determinação da resistência.....	50
2.9	Deteção da resistência a drogas anti-TB por técnicas moleculares	52
2.10	Isoniazida.....	55
2.10.1	Mecanismo de ação da isoniazida	56
2.10.2	Resistência à isoniazida e mutações gênicas associadas	57
2.10.2.1	O gene katG	58
2.10.2.2	O gene ahpC	59
2.10.2.3	O gene inhA	61
2.10.2.4	O gene kasA	62
2.11	Rifampicina	63
2.11.1	Mecanismo de ação da rifampicina	63
2.11.2	Resistência e mutações gênicas associadas	64
2.11.3	O gene rpoB	64
2.12	Pirazinamida	65
2.12.1	Mecanismo de ação da pirazinamida	66
2.12.2	O gene pncA.....	67
2.13	Etambutol.....	68
2.13.1	Mecanismo de ação do etambutol.....	68
2.13.2	Resistência ao etambutol e mutação embB	69
2.14	Estreptomicina	70
2.14.1	Mecanismo de ação da estreptomicina	71
2.14.2	Resistência à estreptomicina e mutações gênicas associadas.....	71
2.15	Considerações finais.....	71

3	OBJETIVOS	74
3.1	Objetivo geral.....	74
3.2	Objetivos específicos	74
4	MÉTODO	76
4.1	Caracterização do estudo	76
4.2	Casuística	76
4.3	Caracterização dos pacientes e das amostras	77
4.3.1	Critérios de inclusão	78
4.3.2	Critérios de exclusão	78
4.3.3	Critérios de perda	78
4.4	Locais e estudos desenvolvidos.....	78
4.5	Material	80
4.6	Método	81
4.6.1	Dinâmica da coleta e processamento do material	81
4.6.2	Testes de sensibilidade qualitativo a drogas anti-TB pelo sistema BACTEC 460	85
4.6.3	Testes de sensibilidade quantitativo a drogas anti-TB pelo sistema BACTEC 460 (determinação da CIM)	85
4.6.4	Prova da pirazinamidase (PZase)	86
4.6.5	Testes moleculares.....	86
4.6.5.1	RFLP	86
4.6.5.2	Análise genômica para detecção de mutações associadas à resistência à isoniazida, pirazinamida e etambutol por sequenciamento automático do DNA	89
4.6.5.3	Análise genômica para detecção de mutação associada à resistência à rifampicina por rifoligotyping (PCR reverse line blot hybridization).....	90
4.6.6	Análise dos resultados	90
4.6.7	Considerações.....	91
5	RESULTADOS	93
5.1	Caracterização dos pacientes	93
5.2	Caracterização fenotípica das cepas de <i>M. tuberculosis</i> por método qualitativo e quantitativo para as drogas anti-TB.....	98
5.2.1	Perfil de sensibilidade qualitativo das cepas de <i>M. tuberculosis</i>	98
5.2.2	Perfil de sensibilidade quantitativo das cepas de <i>M. tuberculosis</i>	99
5.2.3	Correlação entre teste de sensibilidade das cepas e uso prévio da droga 100	

5.2.4	Correlação entre teste de sensibilidade das cepas e evolução clínica dos pacientes.....	102
5.3	Caracterização genotípica das cepas.....	103
5.3.1	Análise do polimorfismo de DNA.....	103
5.3.2	Análise de mutações gênicas e correlação com resistência quantitativa às drogas anti-TB.....	105
5.3.2.1	Isoniazida.....	105
5.3.2.2	Rifampicina.....	108
5.3.2.3	Pirazinamida.....	110
5.3.2.4	Etambutol.....	112
6	DISCUSSÃO	115
6.1	Caracterização dos pacientes	116
6.2	Caracterização fenotípica das cepas: perfil de sensibilidade das cepas de <i>M. tuberculosis</i> às drogas anti-TB	119
6.2.1	TS quantitativo	121
6.2.2	Correlação entre teste de sensibilidade das cepas e uso prévio da droga 122	
6.2.3	Correlação entre teste de sensibilidade das cepas e evolução clínica dos pacientes.....	123
6.3	Epidemiologia	125
6.3.1	Epidemiologia molecular: análise do fragmento IS6110	126
6.4	Resistência às drogas e mutações associadas	127
6.4.1	Isoniazida.....	127
6.4.2	Rifampicina.....	133
6.4.3	Pirazinamida.....	136
6.4.4	Etambutol.....	139
6.5	Tuberculose resistente: o cenário.....	141
6.6	Limitações.....	143
6.7	Propostas.....	144
6.8	Comentários.....	145
7	CONCLUSÕES	147
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
9	APÊNDICES.....	169
9.1	APÊNDICE A – FICHA DE COLETA DE DADOS	170
9.2	APÊNDICE B - ARTIGOS PUBLICADOS	178
10	ANEXOS.....	179
10.1	ANEXO A – Identificação da micobactéria (método NAP)	180

10.2 ANEXO B - Cultura radiométrica e TS qualitativo pelo sistema BACTEC 460	182
10.3 ANEXO C - TS quantitativo: determinação da CIM pelo sistema BACTEC 460	184
10.4 ANEXO D - Prova da atividade da pirazinamidase (PZase).....	185
10.5 ANEXO E - Análises moleculares.....	186
10.6 ANEXO F - Análise genômica para detecção de mutações por sequenciamento	192
10.7 ANEXO G - Análise genômica para detecção de mutação por PCR reverse line blot hybridization	194

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença milenar, acompanhando o homem desde organizações tribais até a atualidade e constituindo, ainda hoje, causa importante de morbimortalidade. Contudo, nos últimos decênios, além das consequências diretas dessa infecção, passou-se a reconhecer a crescente intratabilidade com as drogas antituberculose (anti-TB) disponíveis. Este fenômeno, determinado pelo surgimento de mutantes bacterianos resistentes a drogas, em decorrência do tratamento irregular e/ou inadequado da TB, tornou-se questão de relevância mundial (PABLOS-MENDEZ *et al.*, 1998).

De forma geral, as principais medidas para limitação da expansão da tuberculose multidroga resistente (TB-MDR) consistem no reconhecimento precoce da resistência e na instituição de terapêutica eficaz. Contudo, vários são os obstáculos que se interpõem ao êxito dessas medidas. Dentre eles, merecem destaque a escolha de esquemas eficazes, toleráveis e de baixo custo, a adesão do paciente ao tratamento e o acesso rápido ao resultado do teste de sensibilidade (TS) do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas anti-TB.

A análise de sensibilidade do *M. tuberculosis* às drogas anti-TB através de métodos bacteriológicos clássicos demandam de 15 a mais de 60 dias após o isolamento primário do microrganismo (CANETTI; RIST; GROSSET, 1963). Por este motivo, a comunidade científica tem concentrado esforços e direcionado suas pesquisas para utilização de tecnologia molecular, o que permitiria a detecção mais rápida de cepas resistentes, a orientação terapêutica precoce e mais efetiva, e o entendimento da ação dos fármacos e dos mecanismos de aquisição da resistência. Do ponto de vista epidemiológico, a identificação e caracterização molecular das cepas resistentes, de determinadas áreas, viabiliza o desenvolvimento de estratégias direcionadas à contenção da disseminação da doença.

Sendo assim, é importante caracterizar o perfil fenotípico e genotípico de cepas resistentes com vistas ao controle mais adequado da doença, uma vez que variações regionais podem ter implicações específicas nesse controle.

O presente estudo apresenta cerca de 60% dos casos de MDR notificados do Estado de Minas Gerais até 2002, sendo o primeiro que avalia seis mutações gênicas associadas às quatro principais drogas anti-TB em combinação, caracterizando a resistência em seus aspectos fenotípicos e genotípicos.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Principais aspectos da doença

A TB é definida como doença infecciosa, crônica, contagiosa, que atinge principalmente os pulmões e vem afligindo a humanidade há mais de cinco milênios. Considerada como a “grande peste branca”, assolou o continente europeu durante o século XVIII e, por ocasião da urbanização, há três séculos, disseminou-se pelo mundo com o colonialismo e a expansão comercial. Apesar de conhecida desde a antigüidade, através da descrição de Hipócrates (460-377 a.C.), teve seu agente etiológico descoberto somente em 1882, por Robert Koch, que foi agraciado com o prêmio Nobel de Medicina em 1905, pela contribuição de seu legado (citado por GRANGE, 1996).

O portador bacilífero de TB pulmonar ou traqueal representa a principal fonte de infecção. Ao falar ou tossir, o indivíduo elimina gotículas contendo bacilos cujas partículas podem ser inaladas imediatamente ou permanecer suspensas no ar até inalação. Contudo, apenas aquelas de diâmetro entre dois a dez micrômetros (μm), contendo um a dois bacilos, alcançam os alvéolos pulmonares. O restante permanece no trajeto da árvore traqueobrônquica, podendo ser eliminado pelo sistema de defesa mucociliar (TARANTINO, LEITÃO DE OLIVEIRA, 1990).

Uma vez infectado, o indivíduo pode permanecer anos ou mesmo toda a vida sem desenvolver a doença, mas dos 5% a 10% que desenvolvem a TB, a maior parte o faz nos dois primeiros anos após a infecção primária.

A evolução para doença manifesta depende de fatores relacionados com o tamanho do inóculo e a virulência da micobactéria, influenciados pelo estado imunológico do hospedeiro. Sem o tratamento adequado, de cada quatro indivíduos bacilíferos, dois evoluem para o óbito, um se cura espontaneamente e um se torna bacilífero crônico.

Cada doente com TB pulmonar, sem tratamento, contamina de dez a 15 indivíduos por ano, mantendo o ciclo.

2.2 Tratamento da tuberculose

O conceito de cura para TB foi estabelecido a partir das décadas de 1940 e 1950, com o desenvolvimento de drogas anti-TB eficazes. Essas drogas permitiram a redução drástica da transmissão e possibilitaram a prevenção da doença através da profilaxia. Durante a década de 1960, os esforços foram centrados na padronização de esquemas terapêuticos, inclusive havendo reajustes regulares. Vários países, dentre eles o Brasil, introduziram, ao final da década de 1970, o esquema terapêutico que consiste no uso de rifampicina (R), isoniazida (H), pirazinamida (Z), por vezes suplementado por etambutol (E) e estreptomicina (S) (COLE, TELENTI, 1995). Este esquema, quando aplicado de forma regular e adequada, possibilita a cura de mais de 90% dos pacientes e ainda permite que os bacilos que adquiriram resistência a uma droga sejam eliminados pela ação das demais (JACOBS *et al.*, 1994).

O tratamento da TB se baseia na ação medicamentosa direta sobre os bacilos, inibindo sua multiplicação, e deve considerar a emergência de cepas resistentes, além de manter o número e a viabilidade dos bacilos de multiplicação lenta em nível mínimo. Esta última função resulta na esterilização dos tecidos. Portanto, a eficácia da quimioterapia (QT) depende da susceptibilidade da cepa e da destruição de bacilos tanto de multiplicação rápida quanto lenta (ISEMAN, 2000d).

Como a resposta terapêutica é variável para cada fração de micobactéria, deve-se considerar a condição fisiológica em que esses bacilos se encontram nos tecidos:

- a) bacilos de crescimento rápido no interior das cavitações pulmonares;
- b) bacilos de crescimento lento que se encontram em local de depleção de oxigênio e baixo pH, como nas lesões caseosas;

- c) bacilos no interior dos macrófagos;
- d) bacilos em estado dormente, forma menos responsiva ao tratamento e provavelmente a fonte mais comum de reativação (INDERLIED, NASH, 1996).

As drogas mais ativas contra bacilos de multiplicação rápida são H, S e R, sendo que esta última também é ativa para aqueles bacilos do *caseum*. A Z age preferencialmente nos bacilos de lesões caseosas e naqueles situados dentro dos vacúolos de macrófagos. Até o momento, existem apenas evidências de que outras drogas, como o metronidazol, poderiam agir sobre bacilos em estado dormente, provavelmente devido à ação desta droga em condições anaeróbicas (INDERLIED, NASH, 1996).

A *American Thoracic Society* (ATS) e o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos da América recomendam esquema com RHZ e duração de seis meses para aqueles indivíduos supostamente infectados por cepas de *M. tuberculosis* sensíveis. A adição de uma quarta droga, de acordo com essas recomendações, pode não ser necessária quando a incidência de resistência primária a H da comunidade for inferior a 4%, e não houver relato de uso prévio de drogas anti-TB, nem história de imigração de países com alta prevalência de TB ou exposição a bacilo resistente (CDC, 1993; ATS, 1994; CDC, 1994).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) elaborou protocolo de tratamento para TB, com revisões periódicas sugeridas pelo Comitê Técnico Científico de Assessoramento à TB, recomendando quatro esquemas para tratamento da doença:

Esquema 1 - 2RHZ/4RH: indicado para todas as formas de TB (exceto a meningoencefálica) com duração total de seis meses, sendo os números referentes à duração em meses de cada droga.

Esquema 1 reforçado (1R) - 2RHZE/4RHE: recomendado para os casos de retratamento em recidivantes ou após o abandono do esquema 1;

Esquema 2 ou M - 2RHZ/7RH: indicado para os casos de tuberculose meningoencefálica;

Esquema 3 – 3SEZ+Etionamida/9E+Et: preconizado para os casos de falência de tratamento com esquema 1 e 1 R (suspeita de resistência micobacteriana às drogas).

Esses esquemas diferem entre si quanto à indicação, duração e tipos de drogas utilizadas (BRASIL, Ministério da Saúde, 2002).

Assim, a TB pulmonar no Brasil é tratada em regime intensivo inicial de três drogas (RHZ) nos primeiros dois meses (que assegura a não emergência de mutantes resistentes a uma das drogas) seguido de quatro meses de R e H (para eliminar os bacilos que persistem no tubérculo). A R e a H são drogas anti-TB potentes, que destroem 99% dos bacilos dentro de dois meses do início da terapêutica; a Z apresenta efeito esterilizante elevado e age nos bacilos semidormentes, não afetados por outras drogas. O uso conjunto de múltiplas drogas permite que a duração do tratamento seja de seis meses. (PALACI *et al.*, 1997).

2.3 Epidemiologia da TB

A TB é conhecida desde a antiguidade nas remotas civilizações do Egito, China e Grécia, sendo responsável por significativa morbidade e mortalidade até o século XIX (ISEMAN, 2000b). No século XX, nos países desenvolvidos, o impacto da doença foi reduzido pela melhoria das condições de vida, tornando-se ainda menor após a implementação de QT efetiva. Contudo, nos países em desenvolvimento, a TB manteve-se endêmica, constituindo sério problema de saúde pública até a atualidade (KOCHI, 1991). Mesmo para aquelas regiões onde a doença estava aparentemente sob controle, a partir de 1980 ocorreu recrudescimento global na incidência da TB. No início da década de 1990, estimou-se que 1/3 da população mundial (1 bilhão e 700 milhões de pessoas) estaria infectada pelo *M. tuberculosis* e a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1993, considera a TB como “emergência sanitária mundial” (JOHNSON *et al.*, 1994; OPRAVIL, 1997; SUDRE, DAM, KOCHI, 1992; WHO, 1999). Infelizmente, se as condições presentes forem mantidas, acredita-se que aproximadamente 200 milhões de pessoas têm risco de

desenvolver a doença nos próximos 20 anos (van SOOLINGEN, 2001). Atualmente, a TB é a causa mais frequente de morte entre as doenças infecciosas, atingindo principalmente a população economicamente produtiva, com idade entre 15 e 49 anos, e provocando cerca de 2 a 3 milhões de mortes anualmente (BLOOM, MURRAY, 1992).

A disseminação da TB foi conseqüente à dificuldade diagnóstica e ao abandono do tratamento, que refletem a falência dos programas de controle da doença. Nos dois últimos decênios, acrescentou-se a esses fatores os fenômenos migratórios (principalmente em países desenvolvidos que recebem indivíduos oriundos de países onde a TB é endêmica), uso de drogas endovenosas, pobreza e, particularmente, ao aparecimento de infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ISEMAN, 2000c; MELO *et al.*, 1996; SNIDER, ROPER, 1992).

Foi demonstrado que indivíduo HIV positivo infectado pelo *M. tuberculosis* tem risco de adoecimento maior do que a população em geral. O coinfetado pelo vírus HIV e *M. tuberculosis* (HIV/TB) apresenta estimativa de desenvolvimento de TB ativa de 5% a 10% ao ano, enquanto para o soronegativo o risco é de 5% a 10% durante toda a vida (DOLIN *et al.*, 1994; LIMA *et al.*, 1997; LUCAS, NELSON, 1994).

O impacto da epidemia da infecção pelo HIV e sua associação com a TB é alarmante para países de diferentes condições sócioeconômicas. A estimativa mundial de infecção pelo HIV em adultos, divulgada pela OMS, foi de 13 milhões para o ano de 2000, com maior concentração na África (9,3 milhões) e na Ásia (2,3 milhões), enquanto que na América Latina seriam 450.000 infectados (HIJJAR, OLIVEIRA, TEIXEIRA, 2001; WHO, 2000).

De acordo com a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) do MS do Brasil, proporção significativa dos casos notificados de TB representa coinfeção com HIV, sendo estimado índice de coinfeção de 3% a 4% do total de casos de TB, ou seja, 150.000 casos no período de 1996/1997 (KRITSKI *et al.*, 1996, 1998, 2000, 2002).

Até 1990, a incidência de TB no Brasil apresentava declínio de 2% a 4% ao ano (BRASIL, Ministério da Saúde, 1997). Ao final da década de 1990, observou-se redução da frequência de declínio para apenas 0,4% ao ano (RUFFINO-NETO, HIJJAR, 1997). Os principais fatores relacionados ao aumento dos casos foram atribuídos a questões estruturais, sistema de saúde ineficaz, falência dos programas de controle da TB, crescimento da população marginalizada, crises econômicas, migrações e a epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (KRITSKI, CONDE, SOUZA, 2000).

O Brasil permanece entre os 22 países responsáveis por 80% dos casos estimados de TB no mundo. Considerando-se as notificações dos anos de 1996 e 2000 para o Brasil, observa-se que no ano de 1996 foram notificados 85.869 novos casos da doença, entre os quais 44.503 de tuberculosos bacilíferos, o que corresponde a coeficiente de notificação de 58,4 casos e 28,4 casos bacilíferos por 100.000 habitantes, respectivamente. Os Estados que mais notificaram foram São Paulo (18.534 casos), Rio de Janeiro (14.972 casos), Bahia (7.896 casos), e Minas Gerais (6.169 casos) (KRITSKI, CONDE, SOUZA, 2000). Em 2000 foram notificados 82.249 casos novos, sendo 38.690 no Sudeste, 23.196 no Nordeste, 9.281 no Sul, 5.901 no Norte e 3.522 no Centro-Oeste. O coeficiente, para o país, foi de 48,4 casos de TB de todas as formas por 100.000 habitantes. Os índices mais elevados encontram-se no Sudeste (55/100.000), Norte (47,4/100.000) e Nordeste (44,4/100.000), enquanto os menores situam-se nas regiões Sul (37,7/100.000) e Centro-Oeste (29,5/100.000). O maior coeficiente observado correspondeu ao Estado do Rio de Janeiro 91,9/100.000 (HIJJAR, OLIVEIRA, TEIXEIRA, 2001).

Segundo dados da Secretaria Estadual de Saúde (SES) de Minas Gerais, através do Sistema Nacional de Agravos de Notificação, nos anos de 2000, 2001 e 2002 notificaram-se 5.053, 5.501 e 5.133 novos casos de TB pulmonar em MG, com 2.278 (45%), 2.914 (53%) e 3.275 (64%) bacilíferos, respectivamente (TAB. 1). O coeficiente de notificação de TB, neste período, apontou 35,6 casos/100.000

habitantes em 2000; 34,2 casos/100.000 habitantes em 2001 e 34 casos/100.000 habitantes em 2002, sendo 13, 16,5 e 18 casos bacilíferos/100.000 habitantes, respectivamente.

TABELA 1 - Taxa de incidência de casos novos de tuberculose, no período de 2000 a 2002, no Estado de Minas Gerais.

ANO	FORMAS PULMONARES				FORMAS EXTRAPULMONARES		TOTAL	POPULAÇÃO DO ESTADO	INCIDÊNCIA por 100.000 habitantes	
	TOTAL		BACILOSCOPIA POSITIVA						BACILÍFERA	TOTAL
	Nº	% (*)	Nº	% (*)	Nº	% (*)				
2000	5.053	81,2	2.278	45,1	1.169	18,8	6.222	17.492.296	13	35,6
2001	5.501	91,0	2.914	53	543	9,0	6.044	17.689.651	16,5	34,2
2002	5.133	83,0	3.275	64	1.045	17,0	6.178	18.343.518	18	34,0

Nota: (*) % de casos em relação ao número anual

Fonte: SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE/MINAS GERAIS, Sistema Nacional de Agravos de Notificação, 2004.

Em Belo Horizonte, de acordo com a Secretaria Municipal de Saúde, no ano de 2001 registraram-se 1.048 casos de TB, incluídos 800 casos de TB pulmonar, sendo 703 bacilíferos (87,8%). Em 2002 foram 777 casos de TB, com 576 casos de TB pulmonar e 495 bacilíferos (85,9%). O coeficiente de incidência anual de TB pulmonar bacilífera notificada foi de 21,39 casos em 2001 e 17,34 casos em 2002, por 100.000 habitantes.

Estes números não demonstram a real dimensão do problema, uma vez que a subnotificação dos casos deve ser considerada. Conforme dados do Ministério da Saúde, FUNASA, Centro Nacional de Epidemiologia (CENEPI), a taxa de incidência de TB em Belo Horizonte e região metropolitana em 2001 corresponde a 61,71 casos/100.000 habitantes (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, FUNASA/CENEPI, 2004).

2.4 Epidemiologia molecular

De maneira geral, a epidemiologia molecular consiste no uso de técnicas moleculares para o estabelecimento de correlações epidemiológicas. Esses métodos baseiam-se em sistemas de tipagem molecular que permitem a análise e distinção de sequências de ácidos nucleicos dos isolados epidemiologicamente relacionados (derivados de expansão clonal de precursor comum) daqueles não relacionados. Eles são possíveis devido à estabilidade da sequência estudada da cepa e de sua diversidade dentro da espécie (MASLOW, MULLIGAN, ARBEIT, 1993), e objetivam identificar a distribuição, transmissão e manifestação da doença na população, visando intervenção e prevenção (FOXMAN, RILEY, 2001; SMALL *et al.*, 1994, van EMBDEN, CAVE, CRAWFORD, 1993).

Essa tecnologia tem sido utilizada na TB para avaliar programas de controle, monitorizar surtos, discriminar reativação endógena de reinfecção exógena, rastrear clones de importância para saúde pública, identificar contaminação cruzada e transmissão nosocomial, dentre outros.

Dos métodos de genotipagem utilizados, o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - polimorfismo do tamanho dos fragmentos gerados por enzima de restrição) tem sido considerado técnica de eleição, devido à sua reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade para realização e interpretação. Este método baseia-se na detecção do número e posição genômica da sequência de inserção IS6110 específica de espécies do complexo tuberculoso (van EMBDEN, CAVE, CRAWFORD, 1993) e consiste na extração do DNA (ácido desoxiribonucleico) cromossomal, digestão com enzima de restrição *Pvu* II e hibridização por *Southern blotting* com utilização de sonda específica.

O genoma do *M. tuberculosis* apresenta 10 a 50 cópias da sequência IS6110 (BARNES, CAVE, 2003). Estudos têm demonstrado que linhagens de micobactéria tuberculosa diferentes possuem padrões polimórficos distintos associados ao IS6110. Dois ou mais isolados são definidos como pertencentes ao mesmo *cluster*, caso seus padrões de RFLP sejam idênticos. Isolados que apresentam padrões de

RFLP distintos de todos os outros padrões são considerados não relacionados (SUFFYS *et al.*, 1997, TENOVER *et al.*, 1997).

Apesar de mais utilizado na epidemiologia molecular, o RFLP possibilita também a identificação rápida da susceptibilidade às drogas anti-TB, além de discriminar se houve desenvolvimento de resistência ou reinfeção em um segundo episódio de TB, permite avaliar surtos e identificar *clusters* ou aglomerados (BARNES; CAVE, 2003).

2.5 Tuberculose resistente às drogas anti-TB

A resistência aos fármacos na TB foi originariamente descrita em ensaios clínicos para o tratamento antituberculoso com S, em 1947. Na ocasião, observou-se que algumas cepas, antes susceptíveis à S, apresentaram falha terapêutica com o uso da droga. A partir de então, criou-se o conceito de que o tratamento com droga única na TB poderia selecionar bacilos resistentes (McDERMOTT *et al.*, 1947).

Em verdade, a população de micobactérias não é homogênea e algumas podem apresentar resistência devido a processos espontâneos de mutação. Assim, a pressão seletiva da monoterapia pode selecionar frações de bacilos onde ocorreu mutação espontânea. Entretanto, esse evento é raro, e pouco provável se for utilizada associação de drogas para o tratamento (ELLNER *et al.*, 1993; WOOD, 1993).

Se a prevalência de mutação espontânea à H for de 1×10^6 organismos e à R for de 1×10^8 organismos, para gerar resistência às duas drogas são necessários 1×10^{14} organismos (DAVID, 1970; GOBLE, 1986).

A cavidade tuberculosa no pulmão pode conter até 10^9 organismos, e mesmo se houver alguns bacilos resistentes à H ou à R, habitualmente não se observará nenhum resistente a ambas. Todavia, se a micobactéria infectante for

primariamente resistente à H, o uso de H e R vai funcionar como monoterapia (CANETTI, 1965).

Assim, na realidade, todas as cepas de *M. tuberculosis* que apresentarem níveis significativos de resistência a drogas, refletem principalmente o impacto da QT prévia no fenótipo da cepa, ou seja, seleção. Cepas selvagens apresentam poucos mutantes, que não constituem população significativa de resistência na ausência de pressão seletiva das drogas (DAVID, NEWMAN, 1971).

Ressalta-se que os mecanismos de resistência decorrentes de mutação conferem resistência a uma única droga ou àquelas similares. Este fato é comprovado através de análises moleculares, capazes de indicar que a resistência às drogas se situa em *locus* específicos no genoma das micobactérias, sendo certo que a resistência é adquirida a uma droga de cada vez, de forma independente (ELLNER *et al.*, 1993; WOOD, 1993).

No que concerne à nomenclatura de micobactéria tuberculosa resistente, ainda há controvérsia. Frequentemente, o padrão de resistência é definido como primário ou secundário (adquirido), determinando se a cepa isolada teve ou não contato com as drogas anti-TB. Entretanto, a “resistência primária” pode representar também resistência “transmitida” quando o paciente é infectado por cepa resistente previamente modificada pelo uso das drogas (KRITSKI *et al.*, 1996). Neste sentido, alguns autores sugerem a expressão resistência transmitida para cepas resistentes de padrão de resistência similar à fonte conhecida ou caso índice (ISEMAN, 2000a).

Em 2000, a OMS sugeriu a reavaliação da terminologia e considerou que o isolamento de cepa resistente de paciente virgem de tratamento deveria ser referido como resistência de caso novo (em vez de resistência primária) e que o isolamento de cepa resistente de paciente sob tratamento há pelo menos um mês deveria ser definido como resistência à droga em paciente previamente tratado (resistência adquirida).

A resistência cruzada, bem menos comum, está associada ao uso de drogas farmacologicamente relacionadas ou que apresentem mesmo alvo de ação, como a H e R (WHO, 2000). A resistência combinada é a resistência global, soma de resistência primária e secundária (ISEMAN, 2000a).

Classifica-se como monorresistência se o padrão de resistência for de apenas uma dentre as cinco drogas de primeira linha, resistência composta aquela a duas ou mais drogas (exceto H e R) e multirresistência quando a cepa é resistente a, pelo menos, R e H (ISEMAN, 2000b). Deve-se, contudo, considerar que, o conceito de TB-MDR é distinto para o MS do Brasil.

A TB-MDR é definida internacionalmente como resistência à R e à H, mas, no Brasil, refere-se a uma concepção operacional, ou seja, pacientes que não se curam com os esquemas padronizados pela Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária (CNPS/MS), ou seja, falência aos esquemas padronizados (I, I R e III) e portadores de bacilo resistente a três drogas, incluindo-se a R e H (II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004). Além da TB-MDR, recentemente têm-se identificado a resistência extensa às drogas (TB-XDR) ou TB super-resistente, que compreende resistência combinada a R e H, em adição a uma fluorquinolona e pelo menos uma das seguintes drogas injetáveis: capreomicina, kanamicina e amicacina (CDC 2006; JASSAL, BISHAI, 2009; RAVIGLIONE, SMITH, 2007; WHO 2008).

Estudos epidemiológicos determinaram os fatores de risco para multirresistência que, além do tratamento prévio, incluem residência em área endêmica de resistência a drogas e contato com paciente com TB-MDR ativa. Todavia, em apenas 40% dos pacientes consegue-se identificar um fator de risco (KRITISKI, 2002).

Assim, sendo possível, recomenda-se na primoinfecção ou falência terapêutica, a realização dos TS às drogas anti-TB de primeira linha (BLOCH, 1994). Esta recomendação foi adotada pelo CDC e ATS devido à observação do aumento da

resistência; entretanto, a maioria dos autores concorda com o esquema básico para o tratamento inicial de todos os casos de TB, mesmo em áreas urbanas (onde a resistência primária pode ser maior que 4%), desde que o paciente não tenha recebido essa medicação anteriormente (ATS, 1994; BARNES, 1987; CDC, 1993; NEVILLE *et al.*, 1994).

Geralmente, em países desenvolvidos, tem-se observado a emergência da TB-MDR em surtos, principalmente associados ao HIV, devido à maior susceptibilidade desses pacientes e à transmissão nosocomial. Nos países em desenvolvimento, a TB-MDR é geralmente adquirida e conseqüente a esquemas de tratamento de baixa potência, irregularidade na tomada de remédios e alta taxa de abandono do tratamento (VERONESI, FOCACCIA, 2002).

No Brasil, a multirresistência primária parece ser rara, ou não tem sido comprovada, devido à indisponibilidade dos TS nos laboratórios clínicos. Quando presente, acomete principalmente portadores do HIV, profissionais de saúde e comunicantes intradomiciliares de TB-MDR. Considerando-se que o país utiliza esquemas de tratamento eficientes, a maioria dos casos ocorre por uso irregular de drogas anti-TB e/ou abandono do tratamento. O paciente contribui para a seleção de resistência não somente pela utilização equivocada da terapêutica e descontinuidade do esquema, mas, inclusive, pela má absorção de drogas de administração por via oral. Observa-se que, frequentemente, é difícil determinar se a resistência é primária ou adquirida. No Brasil estima-se que a TB-MDR representa cerca de 0,5% a 1,0% dos casos notificados (cerca de 400 a 800 casos por ano) (KRITSKI, 2002).

Aproximadamente 40 anos após o início do uso de drogas anti-TB, constata-se que a distribuição geográfica de cepas resistentes é muito diversa. Nas comunidades com população estável e programas de tratamento efetivos, a frequência da resistência é muito baixa. Contudo, algumas regiões apresentam combinações variadas entre a resistência própria (indígena) e aquela adquirida através da migração de indivíduos com doença ativa ou latente (BLOCH *et al.*, 1994).

É evidente que o conhecimento da resistência local possibilita intervenções direcionadas. Entretanto, justamente as regiões que mais necessitam de informações são as que menos têm possibilidade de obtê-las. Áreas de alta densidade demográfica, compostas de população pobre, com elevada taxa de TB (inclusive, algumas vezes, associada à coinfeção pelo vírus HIV), tratamentos inadequados e ausência de laboratórios especializados, frequentemente apresentam índices elevados de resistência (ISEMAN, SBARBARO, 1992; WHO, 1999).

Para remediar essas deficiências, a *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* (IUATLD, 2001) e a OMS (WHO, 2000) iniciaram programa internacional de vigilância, objetivando monitorizar os padrões de resistência, cujo objetivo é o direcionamento de programas de tratamento e prevenção, essenciais para a compreensão e melhoria dessas questões regionais (ESPINAL *et al.*, 2001).

No Brasil, iniciou-se a utilização efetiva de esquemas terapêuticos para tratamento da TB na década de 1960. Vários estudos demonstram que, desde essa época, têm sido empreendidos esforços no sentido de se conhecer o perfil de sensibilidade das micobactérias e os fatores associados à resistência desses isolados (ANDRADE; SOLARI; BECKER, 1975; FANDINHO *et al.* 1999; LIMA FILHO *et al.* 1980; MAGARÃO *et al.* 1967; MARRA, 1967; PINTO *et al.*, 1996; PINTO *et al.*, 2001; ROSEMBERG, WAISBICH, 1967; SALEM *et al.* 1990; SILVA *et al.*, 1992). Esses estudos evidenciam que a resistência, em geral, associa-se à irregularidade da administração do tratamento e, mais recentemente, com a coinfeção pelo HIV.

O MS realizou estudo nacional de resistência das cepas de *M. tuberculosis* em pacientes atendidos nos Postos de Saúde. Os dados preliminares indicam prevalência da TB-MDR (H e R) de 1% (KRITSKI, CONDE, SOUZA 2000). Nesse estudo não foi avaliada a prevalência de infecção pelo HIV e nem incluídas amostras clínicas de pacientes atendidos em hospitais. Contudo, outro estudo, realizado em Centro de Referência para Tratamento da SIDA, em São Paulo, demonstrou prevalência de resistência primária à H e R de 11% e adquirida a uma

ou mais drogas de 33%. No Rio de Janeiro, dois hospitais gerais de referência apresentaram 15% e 5% de resistência à R. Esses dados diferem daqueles obtidos em unidades de saúde ambulatoriais (GERHARDT FILHO, HIJJAR, 1993; KRITSKI, SILVA, CONDE, 1998; PINTO *et al.*, 1995).

Acredita-se que, provavelmente, a TB-MDR primária no Brasil esteja ocorrendo em situações de relação com o HIV. Entretanto, as informações nacionais ainda são precárias (PINTO *et al.*, 1995; TOLEDO *et al.*, 1995).

SILVA e outros (2001), realizaram estudo retrospectivo avaliando 170 cepas de micobactérias isoladas entre 1993 e 1995 em duas regiões de alta prevalência de TB no Estado do Rio Grande do Sul. Dentre 170 cepas, 96 foram isoladas de pacientes sem história prévia de TB ou imunodeficiência, 52 de pacientes tratados para TB e 22 de HIV positivos. Observaram, ainda, taxas de multirresistência de 10%, 44% e 18%, respectivamente.

Publicações (ESPINAL *et al.*, 2001; PABLOS-MENDEZ *et al.*, 1998), referentes a projetos de vigilância conduzidos pela OMS e IUATLD, objetivando avaliar a prevalência da resistência aos fármacos anti-TB, no período de 1996 a 1999, em 58 regiões geográficas dos seis continentes, demonstraram que a TB resistente no continente americano (nos países contemplados pelo estudo) e na maioria dos países africanos (mesmo naqueles com elevadas taxas de infecção pelo HIV) não representa sério problema de saúde pública. Em relação à Europa Ocidental, Oriental e Austrália, a TB apresenta aumento da prevalência, provavelmente decorrente da imigração. Os países mais populosos do mundo, China e Índia, atingem oito milhões de casos de TB incidente (39%), sendo que 75% dos casos do mundo estão nos cinco países da Ásia. Nesse inquérito mundial, o Brasil participou com amostra representativa de 2888 cepas de pacientes atendidos ambulatorialmente, tratados (n=793) e não tratados previamente (n=2095). A taxa de resistência a uma droga entre pacientes não tratados anteriormente foi de 6,4% (3,8% à H; 2,4% à S; 0,1% ao E, 0,2% à R). Nesse caso a resistência associada a R e H foi de 0,9%. Entre os pacientes com tratamento prévio observou-se

resistência de 7,3% (4,8% a H; 2,4% a S; 0,1% a E, 0,6% a R) com resistência à R e H de 3,9%. O aumento da taxa global de multirresistência (RH) demonstra a importância do uso prévio de medicamentos anti-TB no desenvolvimento da resistência (BRASIL, Ministério da Saúde, 2002).

Algumas considerações foram propostas quanto à distribuição da resistência a drogas em vários países ou grupos populacionais. Naquelas regiões com baixa prevalência de TB, relativamente prósperas, demograficamente estáveis e que contam com sistema de saúde ou tratamento organizado, a prevalência da resistência apresenta tendência a situar-se abaixo de 5%. Nesse caso, os padrões migratórios determinam grande influência na prevalência. Em países pobres, com limitadas fontes de recursos para saúde, onde as drogas anti-TB não estão disponibilizadas, a prevalência da TB-MDR é baixa, apesar das elevadas taxas de prevalência de TB. Contudo, o padrão mais preocupante encontra-se em países em que a TB é prevalente, a medicação é disponível, mas o sistema de saúde e a distribuição das drogas para o tratamento são precários. Essa situação promove taxas de resistência de até 30% a 50%, com vários casos de MDR (ISEMAN, SBARBARO, 1992). O conhecimento desses fatos permite a compreensão da tendência mundial quanto à distribuição da TB-MDR.

2.6 O bacilo *M. tuberculosis*

O gênero *Mycobacterium* é composto de bastonetes retos ou ligeiramente curvos, imóveis, não esporulados, e não capsulados. Diferem de outros gêneros bacterianos em uma série de propriedades, a exemplo da quantidade e tipos de lipídios presentes em sua parede celular. Os ácidos graxos da parede celular, tais como ácidos micólicos e ceras, conferem resistência ao álcool-ácido, observada na técnica de coloração de Ziehl-Neelsen pela resistência à descoloração.

O *M. tuberculosis* é um microrganismo intracelular facultativo e aeróbico estrito, multiplica-se lentamente, com tempo de geração de aproximadamente 18 horas em condições de temperatura próximas a 37°C. Sua parede celular contém uma

camada localizada abaixo do peptídeoglicano, excepcionalmente rica em lípides, glicolípídios e polissacarídeos. Esta composição lhe permite resistir à ação de anti-sépticos e antibióticos (WAYNE, KUBICA, 1986).

A recente descoberta de vias biossintéticas responsáveis pela produção de constituintes da parede celular, como ácido micólico, ácido micocerósico, fenoltiocerol, lipoarabinomanose e arabinogalactomanose, dentre outros, contribuem para longevidade da micobactéria, desencadeiam a resposta inflamatória do hospedeiro e determinam a patogênese (CASTRO, TRABULSI, 1991).

O *M. tuberculosis* teve recentemente seu genoma completamente seqüenciado (cepa H37Rv de *M. tuberculosis*). Esse genoma é rico em DNA repetitivo, particularmente da sequência de inserção *IS6110* (COLE *et al.*, 1998).

2.7 Mecanismos moleculares associados à resistência

A bactéria torna-se resistente através de modificações genotípicas e fenotípicas. A resistência fenotípica não é causada por mutações genéticas, sendo que a bactéria se torna susceptível quando fora de estado estacionário ou dormente, ou seja, quando em crescimento ativo. Neste caso, a resistência da micobactéria é transitória. A resistência genotípica, demonstrada através de análises moleculares, sugere que a resistência seja adquirida pelos bacilos através de alteração do alvo da droga, mutação gênica ou pela “super produção” do alvo (INDERLIED, NASH, 1996).

Plasmídios e transposons não têm sido associados aos mecanismos de resistência a drogas no *M. tuberculosis*, ou seja, não há comprovação científica que documente a transferência de material gênico para o bacilo. A resistência no *M. tuberculosis* decorre de mutações em genes cromossômicos. Assim, a mutação simultânea a duas ou mais drogas é produto de probabilidade individual, sendo, portanto, resistência multiplicativa, envolvendo diferentes genes.

Todavia, a resistência não confere à bactéria nenhuma vantagem seletiva, a não ser quando exposta à droga. Sob tais circunstâncias, as cepas sensíveis são destruídas e as resistentes proliferam (INDERLIED, NASH, 1996). Em relação à virulência, é provável que algumas linhagens resistentes apresentem menor patogenicidade, principalmente associada à deficiência enzimática decorrente da mutação (HEYM *et al.*, 1994; WILSON, COLLINS, 1996).

A probabilidade de resistência é mais elevada para drogas anti-TB menos eficazes (ex.: etionamida), intermediária para drogas como H e E e baixa para a R, sendo também diretamente proporcional à carga bacteriana (INDERLIED, NASH, 1996).

A seleção em série, ou seja, seleção de cepa com um tipo de mutação seguida de nova seleção para mutação referente a outra droga, é o mecanismo predominante para o desenvolvimento de cepa MDR, sendo que, geralmente, pacientes portadores de cepas MDR constituem um *pool* das infecções crônicas e propagam a resistência primária “transmitida” de MDR. Essas mutações são geralmente produto do tratamento inadequado ou não aderência ao tratamento (INDERLIED, NASH, 1996).

2.8 Testes para determinação da resistência

A realização de testes para determinação da resistência às drogas com intuito de adequar o manejo dos pacientes e monitorizar os níveis de resistência é importante e necessário. Porém, os métodos disponíveis que envolvem cultivo de isolados em meio sólido são trabalhosos e lentos.

São reconhecidos como métodos para medição de sensibilidade da micobactéria às drogas o método das proporções, o radiométrico, a concentração absoluta e a razão de resistência. Dentre esses, os mais utilizados são os métodos das proporções e o radiométrico (INDERLIED, NASH, 1996).

Os TS são usualmente eficazes para a avaliação da maioria das drogas anti-TB. Contudo, para a Z, os TS “in vitro” são dificultados e restringidos pelas condições de acidez (pH 5.5- 6.0) necessárias para a atividade ótima da droga (MACKANESS, 1956; McDERMOTT, TOMPSETT, 1954).

Apesar dessas limitações: demora do resultado, custo e dificuldade de padronização, a caracterização fenotípica de cepas, classificando sua sensibilidade em relação às drogas, costuma ser indispensável para determinados casos.

O método das proporções foi descrito por CANETTI em 1963 e consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes presentes em uma amostra de isolado, frente à concentração da droga que é capaz de inibir o desenvolvimento das micobactérias sensíveis, mas não o das resistentes. Para cada droga, foi definida a proporção de mutantes resistentes. Igual ou acima desta proporção o isolado é considerado resistente (CANETTI, GROSSET, 1986). O método das proporções pode ser direto ou indireto. Se direto, a amostra positiva é inoculada diretamente no meio contendo ou não drogas. No indireto, utiliza-se cultura de micobactéria pura como inóculo. A vantagem do método de proporções direto é fornecer resultados mais precoces, de três a quatro semanas antes do indireto (INDERLIED, NASH, 1996).

Métodos baseados na produção de dióxido de carbono (CO₂ marcado, como do sistema BACTEC – MB BACT), possibilitam resultados mais rápidos, inclusive permitindo a detecção da CIM, equiparando-se em sensibilidade aos métodos convencionais. Entretanto, são dispendiosos e demandam importação de insumos.

No método radiométrico, incuba-se o meio de cultura contendo micobactérias e drogas e a razão do crescimento é medida pela detecção do CO₂ marcado liberado pelas micobactérias, assim determina se a amostra é sensível ou não à droga pesquisada (WATTERSON, DROBNIEWSKI, 2000). Esse método é validado pela OMS.

Os critérios para realização de TS foram modificados nos últimos anos mediante a crescente incidência de resistência. Atualmente, nos Estados Unidos, recomenda-se que todos os primeiros isolados do paciente tuberculoso sejam submetidos aos TS pelos órgãos públicos de saúde. Outras recomendações incluem positividade de amostras após negativação de baciloscopia, suspeita de resistência primária (área de elevada incidência de MDR) além de doença disseminada (miliar) ou meningite. Naquelas áreas onde a taxa de MDR é baixa, recomenda-se, por prudência, estocar as amostras congeladas por seis meses para, se necessário, realizar exame posteriormente (INDERLIED, NASH, 1996). No Brasil, o TS para drogas anti-TB não é realizado rotineiramente, apesar de recomendado para casos de retratamento e suspeita de TB resistente.

2.9 Detecção da resistência a drogas anti-TB por técnicas moleculares

O sequenciamento completo do genoma do *M. tuberculosis* e as informações obtidas através das análises detalhadas de bioinformática possibilitaram melhor compreensão sobre a biologia funcional deste patógeno (COLE *et al.*, 1998).

Seu genoma decifrado recentemente compreende 4.411.529 pares de base (pb), com 3.924 proteínas e um conteúdo guanina (G) + citosina (C) de 65,6%, sendo este relativamente constante em todo o genoma. Contudo, diversas regiões apresentaram conteúdo de G+C maior do que a média. Essas regiões correspondem a sequências pertencentes a grandes famílias gênicas que incluem sequências polimórficas ricas em G e C (COLE *et al.*, 1998).

Uma revisão do genoma do *M. tuberculosis*, (cepa H37Rv) apresentada por CAMUS e outros, em 2002, revelou 82 novas sequências que codificam proteínas. Nessa revisão são descritos mais de 300 nomes de genes e observadas modificações no comprimento de 60 deles. A análise genômica permitiu caracterizar a função de 2058 proteínas e demonstrar que somente 376 proteínas putativas não compartilham homologia com outras já conhecidas, sugerindo serem, estas, únicas na espécie.

Como consequência desses estudos genéticos e moleculares, tem sido possível uma melhor compreensão das bases moleculares de resistência do *M. tuberculosis* aos principais fármacos utilizados no tratamento da TB (ZHANG, TELENTI, 2000), e, em particular, a identificação de genes, mutações e mecanismos relacionados com a resistência a esses fármacos (JACOBS, BLOOM, 1994).

Análises genéticas e moleculares de bacilos resistentes sugerem que a resistência é, usualmente, adquirida por alterações no alvo do fármaco como consequência de mutações no gene que codifica este alvo. Durante a exposição do *M. tuberculosis* ao fármaco existe pressão seletiva para mutantes resistentes. As cepas MDR surgem após uma sequência de mutações nos diferentes genes envolvidos com cada um dos fármacos (ZHANG, TELENTI, 2000).

As bactérias utilizam uma série de estratégias para desenvolver a resistência aos fármacos. Tais estratégias podem ser divididas nas seguintes categorias: mecanismos de barreira (redução da permeabilidade e bombas de efluxo); degradação ou inativação de enzimas (ex. β -lactamases); modificação do alvo do fármaco (mutação de um gene alvo). As informações genéticas para tais propriedades podem ser adquiridas via elementos genéticos móveis exógenos (plasmídeos) ou podem residir no cromossomo da bactéria (ZHANG, TELENTI, 2000).

As micobactérias não são diferentes de muitas outras bactérias, no que se refere ao uso das estratégias supracitadas. Sua parede celular tem a capacidade de variar sua permeabilidade a muitos compostos, produzindo enzimas que degradam ou modificam os fármacos e alteram, de maneira espontânea, a mutação cromossomal previsível de regiões alvo nos genes (TELENTI *et al.*, 1997a). Entretanto, a resistência às drogas utilizadas no tratamento da TB depende desse terceiro mecanismo de resistência. A TB-MDR reflete a acumulação de etapas de mutações individuais de diversos genes independentes, e não a aquisição em bloco de resistência a múltiplos fármacos (TELENTI *et al.*, 1997a).

As bases moleculares da resistência são frequentemente mutações gênicas que podem ser detectadas direta ou indiretamente por diferentes técnicas. A reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser usada para amplificar regiões de genes envolvidos na resistência, permitindo a identificação de mutações. Geralmente, realiza-se a PCR seguida da análise dessas sequências mutadas através de: a) sequenciamento do DNA; b) avaliação de polimorfismo conformacional de fragmentos de fita simples (SSCP); c) análise de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (RFLP); que são algumas das técnicas desenvolvidas para esse fim (ROSSETTI *et al* 2002).

O sequenciamento de produtos da PCR (amplicons) é um método direto que detecta e caracteriza as mutações, além de permitir a identificação de diferentes espécies de micobactérias. Constitui método padrão de escolha para validar outros métodos que detectam as mutações indiretamente.

O SSCP baseia-se na diferença da migração de uma fita simples de DNA, que apresenta diferença em sua composição. Durante o processo separam-se, pelo calor, as fitas de DNA, que, após o esfriamento, mantém a sua estrutura secundária. As alterações na estrutura do DNA, causadas pelas mutações, influenciam na velocidade de migração dos segmentos em gel de agarose ou acrilamida.

O RFLP pode ser utilizado para identificação de sequências mutadas como, por exemplo, mutações do gene *katG* envolvido na resistência da micobactéria a H. Neste caso, utiliza-se a enzima de restrição *MspI* que reconhece a sequência 5"CTCGT"3, clivando o DNA da micobactéria na região dos códons 315 e 463 do gene *katG* (*locus* preferenciais associados à resistência à H). Após a clivagem e a realização da PCR, esses fragmentos gerados são comparados às sequências de cepa selvagem (HAAS *et al.*, 1997; MARTTILA, SOINI, HUOVINEN, 1996).

Até o momento, os métodos moleculares mais simples disponíveis para identificação de resistência às drogas anti-TB envolvem apenas a detecção da

resistência à R, através do marcador *rpoB*. Para os outros fármacos de primeira linha, as bases genéticas de resistência não foram elucidadas ou são muito complexas, o que dificulta o desenvolvimento de técnicas de detecção rápida.

Um dos testes moleculares disponível comercialmente que permite a identificação do *rpoB* é o *Line Probe Assay*, desenvolvido recentemente pela Inno-genetics, da Bélgica (DE BEENHOUWER *et al.*, 1995 ; SHAFER *et al.*, 1995). Baseia-se na amplificação por PCR de segmento do gene *rpoB* e posterior hibridização desses amplicons com sondas correspondentes. Nesse kit, utilizam-se cinco sondas de linhagem ou cepa sensível e quatro sondas de cepas resistentes para mutações específicas do gene *rpoB*. A interpretação se dá pela leitura do padrão de bandas, que permite a detecção de mutações do *rpoB*. Esse teste pode ser realizado em isolado de cultura ou diretamente em espécimes clínicos, demandando tempo de realização em torno de 48 horas. A sensibilidade do método, quando realizado em isolados de cultura, varia de 92,2% a 99,0% (SOINI, MUSSER, 2001). Apresenta boa aplicabilidade e facilidade na execução. Contudo, seu elevado custo pode inviabilizar o uso na rotina e há necessidade de confirmação de sua eficácia para os isolados de *M. tuberculosis* do Brasil (ROSSETTI *et al.*, 2002).

Cabe ressaltar que a ausência de mutação nos genes alvo não significa, necessariamente, que a cepa de *M. tuberculosis* avaliada seja sensível, já que pode haver mutação em gene não preferencial, ou que o mecanismo de resistência envolvido não seja molecular, a exemplo do sistema de efluxo da droga.

2.10 Isoniazida

Apesar do uso difundido dessa droga no tratamento e profilaxia da TB e do intenso investimento na pesquisa, pouco se conhece acerca do mecanismo de ação e alvo da H na micobactéria.

Descrita em 1912 por MAYER e introduzida em 1952 por MIDDLEBROOK, (citados por TAVARES, 2001) como uma das drogas anti-TB de primeira linha, a H, ou

hidrazida do ácido isonicotínico, apresenta estrutura simples, composta de um anel piridina e um grupo hidrazida. É o mais antigo e efetivo fármaco no tratamento da TB, apresentando CIM baixa de 0,02-0,05 µg/mL, sendo que a concentração sérica (3-5 µg/mL) da droga excede em muito a CIM e a concentração bactericida mínima. Contudo, a H só é ativa contra organismos em formas replicativas (HEIFETS, LINDHOLM-LEVY *et al.*, 1989; TAVARES, 2001).

2.10.1 Mecanismo de ação da isoniazida

A H é, provavelmente, uma pró-droga que requer, para ativação, a presença da enzima catalase-peroxidase, codificada pelo gene *katG*. Atua através da inibição da biossíntese de ácidos micólicos, que compõem a parede celular, tornando a micobactéria susceptível ao radical oxigênio e outras substâncias (MIDDLEBROOK, COHN, SCHAEFER, 1954; WANG, TAKAYAMA, 1972).

As evidências que embasam esta hipótese decorrem da observação de que na presença de H: a) as micobactérias se tornam frágeis, ocorrendo liberação de material intracelular, inclusive polissacarídeos – usualmente ligados aos ácidos micólicos no meio de cultivo; b) ocorre aumento da viscosidade intracelular, provavelmente secundário ao aumento do volume intracelular ou acúmulo intracelular de precursores da parede celular; c) diminui a hidrofobicidade da célula; e d) ocorre perda da propriedade de resistência ácido-alcoólica. As alterações supracitadas são sugestivas da perda da integridade estrutural e fisiológica da parede celular (INDERLIED, NASH, 1996 ; WINDER, COLLINS, 1982).

A H também afeta o metabolismo do nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD) pela incorporação da nicotinamida ou pela ativação da NAD-glicohidrolase (WINDER, COLLINS, 1968; WINDER, COLLINS, 1969). O modelo do mecanismo de ação da H é apresentado pela FIG. 1.

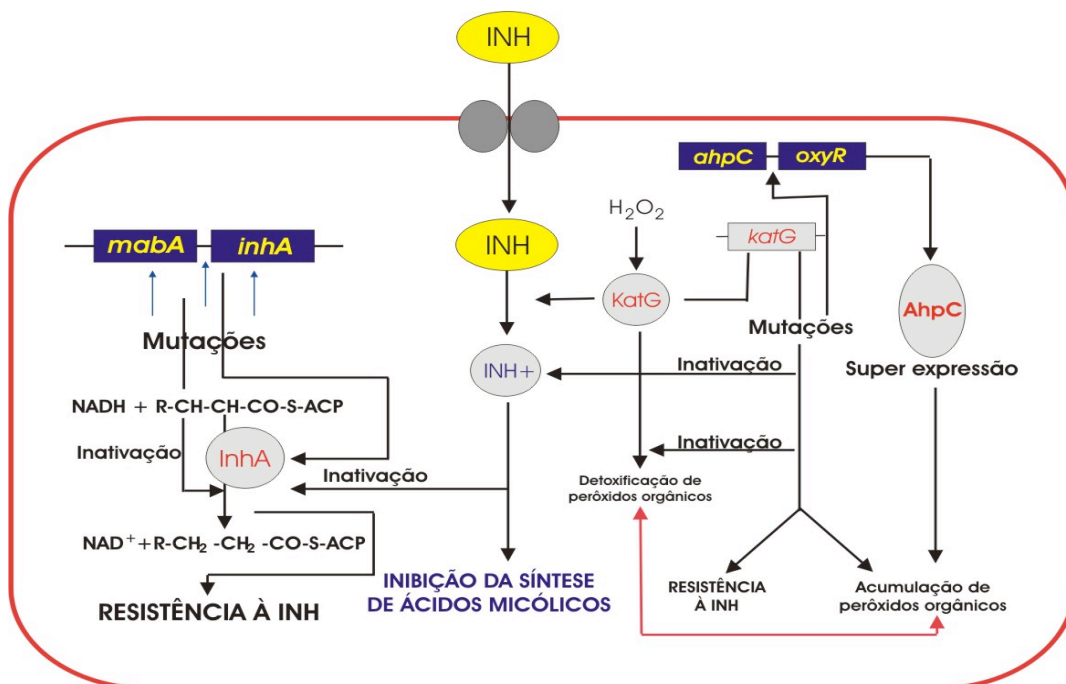


FIGURA 1 - Representação do mecanismo de ação da isoniazida

Nota: A figura mostra as mutações nos genes *katG*, *inhA* e *ahpC* que tornam a H inativada, levando à resistência. Após entrar na célula, a H precisa ser ativada pela enzima catalase-peroxidase, codificada pelo gene *katG*. Somente, então, a H ativada pode inibir a síntese dos ácidos micólicos, impedindo a formação da parede celular. Uma mutação no gene *katG* levaria a um impedimento na ativação da H, e a cepa ficaria resistente. Para compensar a falta da proteína *katG*, ocorre aumento da expressão da proteína *ahpC* que detoxifica os peróxidos orgânicos antes ligados pela *katG*. A mutação no gene *inhA*, por sua vez, impede a incorporação de ácidos graxos, que inibe a síntese de ácidos micólicos e favorece a destruição da parede celular da micobactéria.

Fonte: Modificada de RATTAN, KALIA, AHMAD, 1998, p.195.

2.10.2 Resistência à isoniazida e mutações gênicas associadas

A resistência à H está associada a várias mutações, envolvendo um ou mais genes que codificam enzimas, como *katG* (catalase-peroxidase), *inhA* (enol-ACP redutase), *ahpC* (alquil-hidroperóxido redutase), *kasA* (beta cetoacil-ACP síntase) e *ndh* (NADH desidrogenase) (LEE, LEE, JUNG, 2001).

A resistência a H pode acontecer em decorrência de mutações gênicas. A mutação no gene *katG* que codifica a catalase-peroxidase impede a ativação da H e está associada à resistência de alto ou baixo grau, dependendo do tipo de mutação. Em algumas cepas, a mutação do gene *katG* induz o gene *oxyR-ahpC*, que resulta na superexpressão do *ahpC*, com destruição dos peróxidos orgânicos. A mutação no

gene *inhA*, por sua vez, impede a incorporação de ácidos graxos, que inibe a síntese de ácidos micólicos e favorece a destruição da parede celular da micobactéria.

Algumas cepas resistentes à H não apresentam mutações nos genes *katG*, *inhA*, *ahpC* ou *kasA*, o que pode indicar a existência de outros genes ou mecanismos envolvidos na resistência, embora menos frequentemente (BANERJEE *et al.*, 1994; MDLULI *et al.*, 1998; ROSSETTI *et al.*, 2002; WILSON, COLLINS, 1996; ZHANG, TELENTI 2000).

Mutações pontuais foram identificadas em *ndh*, que codifica a NADH desidrogenase, enzima essencial na cadeia respiratória, regulando a razão de NADH/NAD⁺ nas células (LEE, LEE, JUNG, 2001; MIESEL *et al.*, 1998). Mutações nesse gene apresentam fenótipos pleiotrópicos, incluindo a co-resistência para H e Etionamida (Et) em *M. tuberculosis*. O mecanismo molecular pelo qual mutações em *ndh* conferem resistência ao bacilo é pouco entendido.

2.10.2.1 O gene *katG*

Vários estudos realizados na década de 1950 estabeleceram correlação entre a resistência à H e a atividade da enzima catalase-peroxidase (COHN *et al.*, 1954; MIDDLEBROOK *et al.*, 1954).

MIDDLEBROOK *et al.* (1954) observaram que alguns isolados de *M. tuberculosis* altamente resistentes à H não apresentavam atividade da enzima catalase-peroxidase e frequentemente eram avirulentos para a cobaia.

Posteriormente, ZHANG *et al.* (1992) identificaram o gene *katG* que codifica a enzima catalase-peroxidase e evidenciaram a ausência desse gene em isolados resistentes à H, o que permitiu relacionar a atividade dessa enzima com a resistência à droga.

2.10.2.3 O gene *inhA*

O gene *inhA* codifica a enoil-ACP-redutase dependente de NADH, enzima envolvida na síntese do ácido micólico da parede celular da micobactéria, porção alvo para ação da H (BANERJEE *et al.*, 1994). A forma ativa da H (radical acil-isonicotínico) inibe a enzima pela reação com co-fator de NADH, que bloqueia sítio ativo da enzima, formando ligação covalente de alta afinidade (isonicotínico acil NADH) (ROZWARSKI *et al.*, 1998).

A resistência ocorre através de mutações no sítio ativo da enzima que diminui sua afinidade pelo NADH, sem afetar a sua atividade enzimática ou através do aumento da expressão de *InhA* (BASSO *et al.*, 1998). A redução da ligação da NADH com o *InhA* conduz a baixa vulnerabilidade da *InhA* para atacar radical ativado de H, porque a inibição do *InhA* pelos radicais H requer a presença de NADH ligado a *InhA* (ZHANG, TELENTI, 2000).

Em geral, mutações do *inhA* estão associadas à resistência à H de baixo nível. As mutações no *katG* podem causar resistência de baixo ou alto nível, dependendo das mutações que ocorreram na enzima catalase-peroxidase. Mutações que levam à perda da atividade enzimática geralmente são de alto nível. As mutações de *inhA* não apenas causam resistência à H, mas também conferem resistência à Et (BANERJEE *et al.*, 1994). As FIG. 4 e 5 representam a estrutura do *inhA* e as mutações do *locus inhA* associadas à resistência à H.

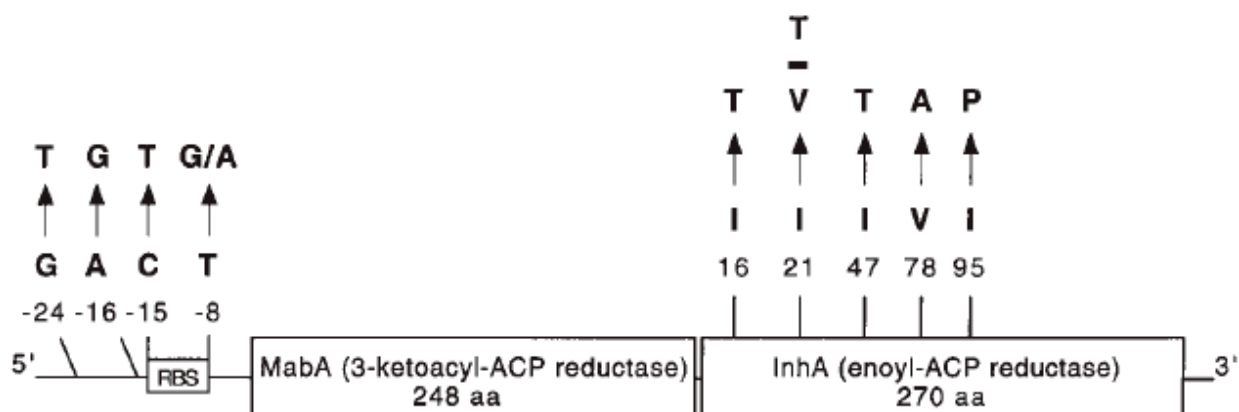


FIGURA 4 - Representação esquemática de mutações identificadas no *locus inhA* de cepas de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida e etionamida.

Fonte: RAMASWAMY, MUSSER, 1998, p.3.

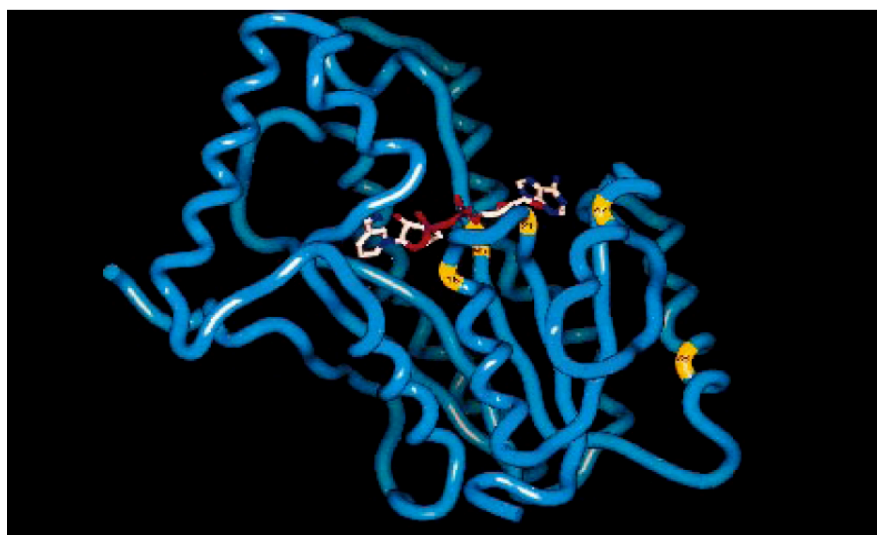


FIGURA 5 - Desenho esquemático com estrutura terciária da proteína do *inhA*, apresentando substituições de aminoácidos, identificadas em cepas de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida.

Fonte: RAMASWAMY, MUSSER, 1998, p.3.

2.10.2.4 O gene *kasA*

Com pequena dose de H (1 µg/mL) pode-se induzir duas proteínas de 12 e 80 kilodaltons (kda) no *M. tuberculosis*. A proteína menor, de 12 kda, apresenta ligação com lípidos e a análise de sequência de aminoácidos demonstrou homologia à *ahpC*. A proteína de 80 kda apresenta homologia a β cetoacil ACP síntase, codificada pelo *kasA*, sendo essa enzima envolvida na síntese de ácido

micólico. Mutações no *kasA* foram encontradas em cepas tanto resistentes quanto sensíveis à H (LEE *et al.*, 2001; MDLULI *et al.*, 1998; ZHANG, TELENTI, 2000).

Sintetizando, os mecanismos genéticos determinantes da resistência à H atuam em três níveis: 1) bloqueio da ativação da droga: *katG*; 2) inativação do intermediário tóxico da H: *ahpC* ; 3) bloqueio da biossíntese do ácido micólico: *inhA* (CAMPOS, 1999). A FIG.1, apresentada anteriormente, explica o mecanismo de ação da H e a participação dos genes envolvidos na resistência.

Estudos bioquímicos e genéticos são necessários para estabelecer o papel das mutações identificadas na resistência à H. Na falta do conhecimento quanto às funções de muitos dos genes, a baixa frequência de mutações observadas nos isolados torna difícil concluir com segurança sobre o papel deles na origem da resistência. A sequência dos dados proporcionada pela análise dos 20 genes estudados por RAMASWAMY *et al.* (2003) é um passo inicial para compreensão do mecanismo complexo da ação de H em *M. tuberculosis*.

2.11 Rifampicina

A R é uma ansamicina lipofílica, derivada semi-sintética da rifamicina, sintetizada inicialmente na Itália, em 1957, a partir do *Streptomyces mediterranei* e introduzida, em 1972, como droga anti-TB (CHAULK, KAZANDJIAN, 1998; HIRANO, ABE, TAKAHASHI, 1999; RAMASWAMY, MUSSER, 1998). É muito ativa contra o *M. tuberculosis*, porque se difunde rapidamente através do envelope celular hidrofóbico e atua na inibição da síntese protéica. É geralmente eficaz contra o *M. tuberculosis* em CIM, que varia de 0,1 a 0,2 µg/mL (BLANCHARD, 1996).

2.11.1 Mecanismo de ação da rifampicina

A atividade antimicrobiana é atribuída à capacidade do seu anel macrocíclico em ligar a RNA polimerase da micobactéria, o que impede a síntese do RNA. Na realidade, a rifampicina liga-se à subunidade β da RNA polimerase, codificada pelo

gene *rpoB*, inibindo a transcrição. Essa ligação droga-ácido nucléico forma complexos firmes e irreversíveis com a enzima (BLANCHARD, 1996). O mecanismo de ação primário da droga é bacteriostático. Todavia, devido à ligação irreversível com a RNA polimerase (enzima), todo o processo de síntese protéica, inclusive do DNA, fica comprometido e a célula é destruída pela não renovação de constituintes vitais.

2.11.2 Resistência e mutações gênicas associadas

A resistência à R é observada menos frequentemente do que a resistência à H e S (WHO, 1997), ocorrendo em 10^8 bacilos. Embora rara, a resistência à R resulta na veloz seleção de mutantes resistentes a outros fármacos do esquema de curta duração. Assim, como a resistência à R pode estar associada à resistência à H, e, sabendo-se que esta é mais frequente que aquela, alguns autores sugerem o uso da resistência à R como marcador para detecção de linhagens MDR (TELENTI *et al.*, 1993).

2.11.3 O gene *rpoB*

Mais de 96% das cepas resistentes à R apresentam mutações na região central de 81 pb do gene *rpoB*, composta de 27 códons. A maioria das mutações do *rpoB* (65%-85%) alteram os códons 526 e 531, resultando em resistência de alto grau, com CIM superior a 32 µg/mL. Porém, nem todas as mutações do gene exibem o mesmo grau de resistência, sendo que alterações dos códons 511, 516, 518 e 522 determinam resistência de baixo grau (MOGHAZEH *et al.*, 1996; OHNO *et al.*, 1996).

Mutações mais raras relacionadas à resistência à R podem ser identificadas na região aminoterminal do *rpoB* (ZHANG, TELENTI, 2000). A maioria dos laboratórios de referência envolvidos com técnicas moleculares avalia somente a região de 81 pb; contudo, SOMOSKOVI, PARSONS, SALFINGER (2001) sugerem avaliação de mutações no terminal amino, quando não for identificada mutação na região de 81

pb. A FIG. 6 apresenta as mutações descritas no gene *rpoB* de cepas de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina

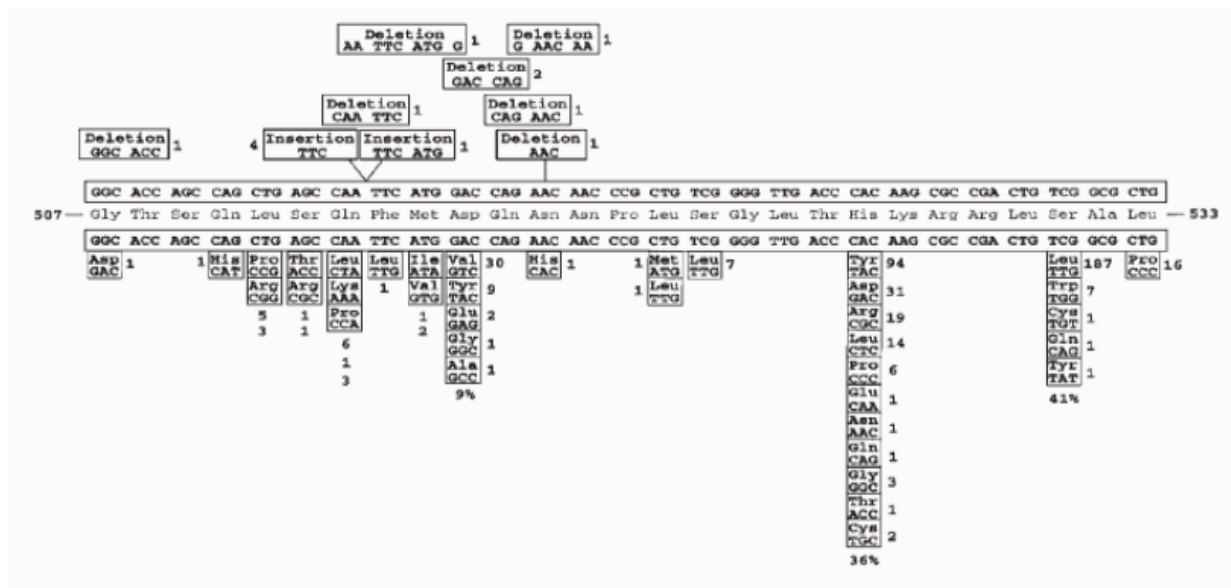


FIGURA 6 - Mutações descritas no gene *rpoB* de cepas de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina.

Fonte: RAMASWAMY, MUSSER, 1998, p.3.

2.12 Pirazinamida

A Z é um análogo estrutural da nicotinamida, convertida no organismo a ácido pirazinóico. A conversão ocorre em pH baixo e depende das enzimas nicotinamidase e pirazinamidase (PZase), produzidas pelo bacilo. É uma droga bactericida que atua nos bacilos de multiplicação lenta. Utilizada em associação à H e R, resultou na redução da duração do tratamento da TB de 9 para 6 meses, sendo que participa nos esquemas de tratamento 1 e 1R (INDERLIED, NASH, 1996; TAVARES, 2001). A ação da Z é altamente específica para o *M. tuberculosis*, tendo pouco ou nenhum efeito sobre outras micobactérias, incluindo o *M. bovis*. Essa espécie demonstra resistência intrínseca ao fármaco (KONNO, KAGAYAMA, OKA., 1959). Esse fato decorre, provavelmente, devido à ausência de atividade da PZase, já que linhagens de *M. bovis* são sensíveis ao ácido pirazinóico (KONNO et al., 1967).

A determinação da sensibilidade das cepas à Z é geralmente obtida através da medição do crescimento bacilar em meio contendo a droga. Todavia, métodos convencionais que estabelecem a CIM demandam até três meses para execução e apresentam elevado coeficiente de variação que limitam seu uso na rotina. Sendo assim, o método radiométrico tem sido considerado padrão ouro. Por outro lado, a avaliação da atividade da PZase tem sido utilizada como preditor de sensibilidade ao fármaco. Isso é possível posto que a atividade de PZase é perdida em cepas Z resistentes. Essa enzima é codificada pelo gene *pncA* e sua identificação possibilitou a compreensão dos mecanismos associados à resistência. Apesar disso, algumas cepas Z resistentes mantêm atividade de PZase sugerindo haver outros mecanismos envolvidos na resistência. Mais recentemente, dois estudos propuseram que a resistência à Z em cepas com PZase positivas estaria relacionada à entrada e efluxo da droga na micobactéria (ZHANG, TELENTI, 2000; ZHANG, MITCHINSON, 2003)

2.12.1 Mecanismo de ação da pirazinamida

Passado mais de 50 anos desde sua descoberta em 1952, não se conhece ainda hoje o mecanismo de ação da droga. Especula-se que seja semelhante ao da H, uma vez que a Z é ativada pela enzima PZase da micobactéria, que converte a droga em ácido pirazinóico (KONNO *et al.*, 1967; SINGAPORE TUBERCULOSIS SERVICE, 1981; SNIDER *et al.*, 1982). Estudos demonstram que cepas de *M. tuberculosis* susceptíveis à Z geralmente apresentam atividade de PZase, que é ausente nas cepas resistentes (KONNO *et al.*, 1967; McCLATCHY, TSANG, CERNICH, 1981). A FIG. 7 apresenta desenho esquemático do mecanismo de ação da Z no *M. tuberculosis*.

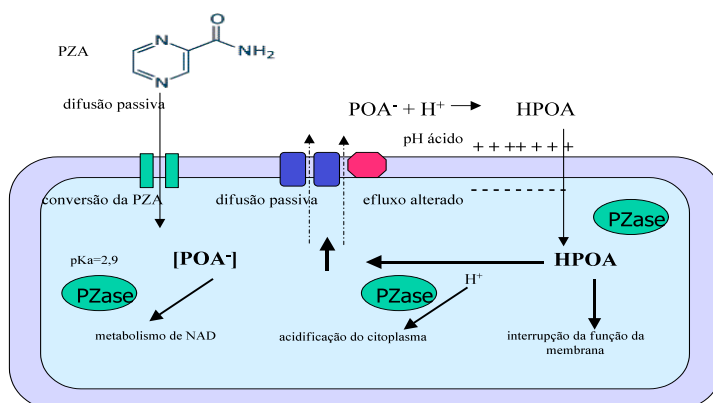


FIGURA 7 - Desenho esquemático do mecanismo de ação da pirazinamida em *M. tuberculosis*.

Nota: ácido pirazinóico (POA); POA protonado (HPOA); pirazinamida (Z); pirazinamidase (PZase)

Fonte: Modificado de ZHANG, MITCHINSON, 2003, p.6.

2.12.2 O gene *pncA*

A maioria das cepas resistentes à Z tem sua resistência conferida por mutações no gene *pncA*, que codifica a PZase, enzima que hidrolisa a droga para torná-la ativa (ZHANG, TELENTI, 2000). Identificado por SCORPIO, ZHANG (1996), o gene *pncA* contém 561 pb e está localizado na posição Rv 2043 da micobactéria. (COLE *et al.*, 1998).

Estudos baseados no sequenciamento de DNA do gene *pncA* de cepas de micobactérias tuberculosas sensíveis e resistentes à Z estabeleceram forte associação entre mutações de *pncA* e resistência à Z (CHENG *et al.*, 2000; HIRANO *et al.*, 1997; LEMAITRE, SOUGAKOFF, TRUFFOT-PERNOT, 1999; MARTTILA, SOINI, HUOVINEN, 1999; MESTDAGH *et al.*, 1999; SCORPIO *et al.*, 1997; SREEVATSAN *et al.*, 1997a). Esses estudos identificaram diversas e distintas mutações amplamente distribuídas pelo gene. A maioria das mutações é de substituição, porém inserções, deleções e mutações regulatórias também foram

descritas (MORLOCK *et al.*, 2000; RAMASWAMY, MUSSER 1998; ZHANG, MITCHINSON, 2003).

MORLOCK *et al.*, (2000) e SOINI, MUSSER (2001) mostraram que mais de 70% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à Z apresentam mutações no gene *pncA*.

As cepas com baixo nível de resistência à Z estão, geralmente, associadas a alterações nos mecanismos de entrada dos fármacos ou bomba de efluxo de drogas, conforme sugerido por SCORPIO *et al.* (1997) e ZHANG, MITCHISON (2003).

2.13 Etambutol

O E é um composto sintético antimicobacteriano descrito independentemente por THOMAS *et al.* e WILKINSON *et al.* em 1961 (TAVARES, 2001). Tem sido considerado como fármaco de primeira linha, em esquemas de quatro drogas, no tratamento da TB e da micobacteriose atípica, particularmente em co-infectados pelo HIV. No Brasil, persiste como droga alternativa em substituição aos fármacos do Esquema 1, em situações de intolerância, intoxicação, resistência e, principalmente, no Esquema 1R. Nesse caso, está indicado na recidiva após cura ou retorno após abandono. Geralmente, as cepas são sensíveis em concentração $\leq 1 \mu\text{g/mL}$, incluindo aquelas resistentes à H e S.

2.13.1 Mecanismo de ação do etambutol

O E exerce ação bacteriostática sobre bacilos intracelulares e extracelulares, atuando sobre a biossíntese da parede celular, inibindo a polimerização da arabinose, arabinogalactano e lipoarabinomanose, essenciais à incorporação do ácido micólico e formação da parede da micobactéria (TAKAYAMA *et al.*, 1979; TAKAYAMA, KILBURN, 1989). Em 2004, LEE *et al.* sugeriram que o principal alvo

da droga seria a arabinosiltransferase, enzima que promove a ligação do ácido micólico na parede celular.

Essa enzima é uma proteína integral de membrana com 12 domínios transmembrana, onde as principais alterações que determinam resistência ocorrem numa região localizada no *loop* citoplasmático. O E, atuando nesse sítio específico, aumentaria a permeabilidade da parede celular determinando acúmulo de ácido micólico e morte celular (RAMASWAMY *et al.*, 2000). A arabinosiltransferase é codificada pelo operon *embCAB* (operon que codifica a arabinosiltransferase) localizado no genoma de cepas de micobactéria tuberculosa Rv3793, Rv3794, Rv3795 (COLE *et al.*, 1998). Esse operon compreende três genes que codificam a enzima, designados *embC*, *embA*, *embB* (FIG. 8)

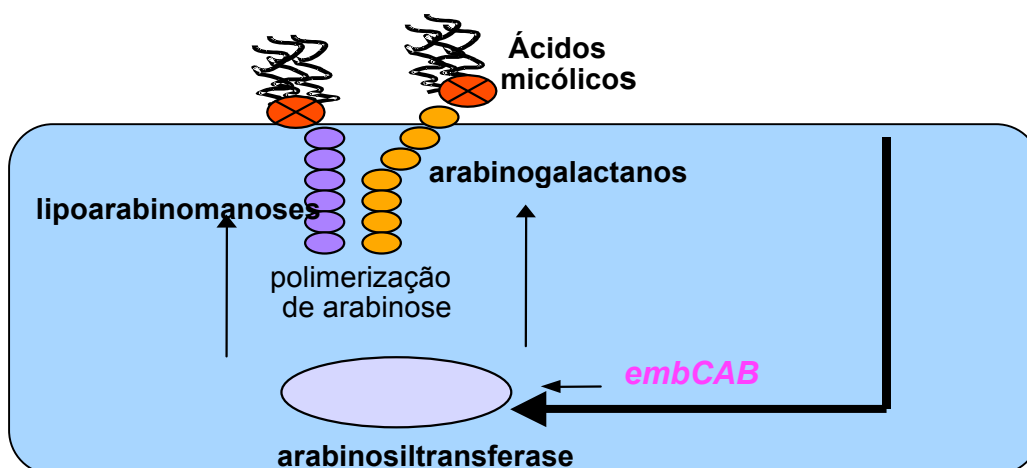


FIGURA 8 - Desenho esquemático do mecanismo de ação do etambutol em *M. tuberculosis*

Fonte: RODRIGUES, 2005.

2.13.2 Resistência ao etambutol e mutação *embB*

A resistência ao E está, na maioria dos casos, associada a alterações no gene *embB* (gene que codifica a arabinosiltransferase). Há indícios de que os genes *embA* e *embB* estariam envolvidos na biossíntese de arabinogalactano e lipoarabinomanano, componentes estruturais da parede celular de micobactéria e que mutações nos genes dessa região determinariam resistência ao E.

TAKAYAMA, KILBURN (1989) foram os primeiros pesquisadores a observarem que o E inibia a transferência do arabinogalactano da parede celular de uma espécie de *M. tuberculosis* e que esse processo resultava em acúmulo de ácido micólico e ésteres. Posteriormente, foi identificado o maior intermediário da biossíntese do arabinogalactano, o beta-D-arabinofuranosilmonofosfodecaprenol. O rápido acúmulo desse intermediário sugere que o alvo do E no bacilo seja a arabinosiltransferase (WOLUCKA *et al.*, 1994).

No estudo de BELANGER *et al.* (1996) foram identificados dois *locus* gênicos que codificam a arabinosiltransferase. Em paralelo, TELENTI *et al.* (1997b) clonaram e seqüenciaram os genes que codificam o alvo do E no *M. smegmatis*, concluindo que seriam três os genes designados como operon *embCAB*. A partir de então, identificou-se, no *M. tuberculosis*, o correspondente ao *embCAB*. Os estudos seguintes revelaram que alterações nesse gene estariam associadas à resistência ao E. Posteriormente, estudos baseados no sequenciamento do operon *embCAB* do *M. tuberculosis* demonstraram a ocorrência de mutações na região associadas à resistência ao E (RAMASWAMY *et al.*, 2000; SREEVATSAN *et al.*, 1997b). Mutações no gene *embB*, mais especificamente no códon 306, região conservada que codifica uma metionina, parecem ser responsáveis por resistência ao E observada em *M. tuberculosis* (RAMASWAMY *et al.* 2000; RINDER *et al.* 2001; TELENTI *et al.* 1997b; ZHANG *et al.* 2003). Entretanto, mutações em outros códons não preferenciais já foram observadas (RAMASWAMY *et al.*, 2000).

2.14 Estreptomicina

A S, descoberta na década de 1940, em culturas de *Streptomyces griseus*, é um aminoglicosídeo predominantemente bactericida, em concentração de 0,3 a 20 µg/mL e bacteriostático em concentração de 0,2-0,4 µg/mL (RAMASWAMY, MUSSER, 1998).

2.14.1 Mecanismo de ação da estreptomicina

A S atua no 30s dos ribossomos, alterando a formação de proteínas da parede celular. Das drogas anti-TB, a S é a única que independe de metabolização hepática estando indicada para o tratamento de portadores de hepatopatias. Além disso, devido as suas características farmacológicas pode ser usada em esquemas intermitentes.

2.14.2 Resistência à estreptomicina e mutações gênicas associadas

A resistência à S ocorre devido a mutações no alvo do fármaco, mais especificamente nos ribossomos. O principal sítio de mutação é o gene *rpsL*, que codifica a proteína ribossomal 12s. Outros mecanismos de resistência descritos dependem do comprometimento no gene que codifica o RNA 16S em duas diferentes regiões (BLANCHARD, 1996) e de alterações relacionadas com a entrada do fármaco para o interior da célula bacteriana.

2.15 Considerações finais

Os mecanismos de resistência do *M. tuberculosis* a drogas são bastante complexos e apresentam grande importância no cenário clínico e epidemiológico. Embora as bases genéticas da resistência ainda não estejam esclarecidas na sua totalidade, para todos os fármacos usados no tratamento da TB, as vantagens oferecidas pelos métodos moleculares são bastante promissoras.

Diante desta premissa, estudos geograficamente definidos, que permitam conhecer os tipos mais frequentes de resistência do *M. tuberculosis* a fármacos e as mutações gênicas associadas, podem ser a chave para o aprimoramento do diagnóstico, tratamento adequado e contribuir na prevenção do desenvolvimento de resistência micobacteriana a drogas.

A tendência das publicações brasileiras em TB foi analisada em artigo recente (KRITSKI *et al.*, 2007). A análise incluiu duas décadas de trabalhos publicados, teses e dissertações registradas na Capes e de artigos indexados em base Medline e SciELO. De acordo com esse estudo, publicações que demandam instrumental molecular foram classificadas como básicas relativas ao desenvolvimento tecnológico, como é o caso do presente trabalho. Cento e quarenta e um artigos (36%) do total de 388 publicações referentes ao período avaliado de 1986 a 2006 foram considerados de laboratório básico.

Mas utilizando como palavras chave: *tuberculosis*, *gene mutation*, *molecular resistance* e *Brazil* é possível resgatar cerca de 10 artigos, incluindo-se o artigo resultante dessa pesquisa (CLEMENTE *et al.*, 2008). Os estudos de VALIM *et al.* (2000), MIRANDA *et al.* (2001), CARVALHO *et al.* (2003), SENNA *et al.* (2006) avaliam a resistência a R, utilizando como marcador de resistência o gene *rpoB*. CARDOSO *et al.* (2004), CARDOSO *et al.* (2007) e mais recentemente DALLA COSTA *et al.* (2009) avaliam resistência molecular a H. Na avaliação da resistência combinada de R e H têm-se o estudo de HOLFING *et al.* (2005). A resistência a Z foi estudada por RODRIGUES *et al.* (2005) e BARCO *et al.* (2006). A resistência a S foi descrita por SPIES *et al.* (2008). Mais recentemente, ANDRADE *et al.* (2009) através do IS6110 e da análise de regiões gênicas associadas a resistência registra um único episódio de TB-MDR por infecção supostamente policlonal. O presente estudo avalia a resistência combinada as quatro drogas de primeira linha através de mutações em seis genes da *Mycobacterium tuberculosis*.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil fenotípico e genotípico de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a drogas anti-tuberculosas de pacientes de hospital de referência em tuberculose no Estado de Minas Gerais.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar os parâmetros demográficos, clínico-propedêuticos e evolutivos dos portadores de cepas resistentes;
- Determinar o perfil de resistência das cepas de *M. tuberculosis* a drogas anti-TB, através de método qualitativo e quantitativo;
- Investigar a presença de mutações dos genes *katG*, *ahpC* e *inhA* para cepas resistentes à H, do gene *rpoB* para cepas resistentes à R, do gene *pncA* para cepas resistentes à Z e do gene *embB* para cepas resistentes ao E;
- Correlacionar o nível de resistência às drogas com as mutações gênicas encontradas.

MÉTODO

4 MÉTODO

4.1 Caracterização do estudo

Estudo transversal descritivo que caracteriza cepas de *M. tuberculosis* resistentes, isoladas de pacientes atendidos no Serviço de Clínica Médica e Pneumologia (Unidade Hospitalar, Ambulatório e Urgência), do Hospital Júlia Kubitschek (HJK) da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), Belo Horizonte, MG, no período de janeiro de 2001 a janeiro de 2002, através da identificação e quantificação do nível de resistência a drogas anti-TB, correlacionando-as com mutações gênicas.

4.2 Casuística

Durante período do estudo foram identificados 160 casos de TB pulmonar presuntiva ou confirmada, sendo que 76 pacientes, por serem considerados prováveis portadores de cepas resistentes, tiveram amostra de secreção respiratória coletada para realização de TS a drogas anti-TB. Foram identificados 24 casos de portadores de cepas resistentes a qualquer uma de cinco drogas anti-TB (H, R, Z, E, S) (FIG. 9).

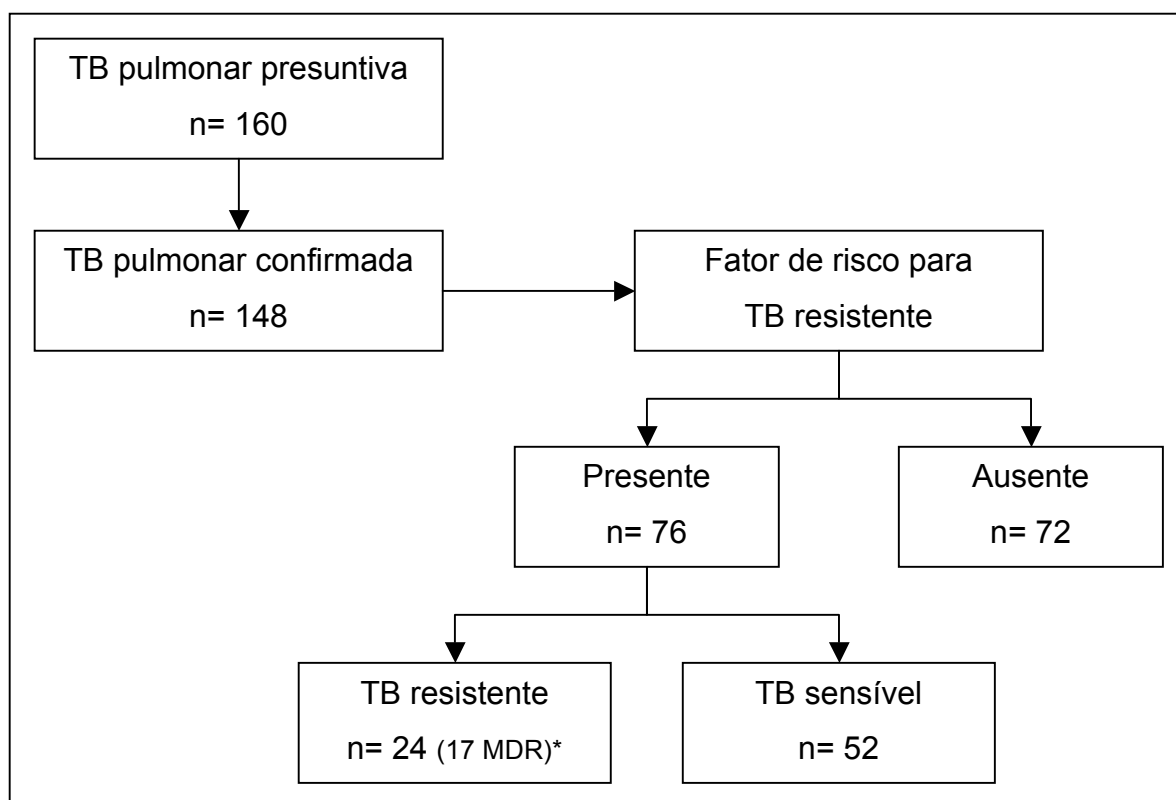


FIGURA 9 - Seleção de pacientes e amostras

Nota: TB: tuberculose; * correspondente a cerca de 60% de TB-MDR do Estado de Minas Gerais
Fonte: Dados do autor

4.3 Caracterização dos pacientes e das amostras

Participaram desse estudo pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos, com suspeita clínica de TB pulmonar resistente, baseado em um ou mais dos seguintes critérios:

- falência terapêutica, definida pela não melhora clínica e/ou persistência de baciloscopia positiva no quarto mês de tratamento ou positividade da baciloscopia após negatificação nos controles mensais;
- abandono de tratamento (>30 dias sem uso de drogas anti-TB);
- irregularidade de tratamento, considerado pela não ingestão de medicação por 5 dias contínuos ou 10 dias alternados;
- história de contato com portador de cepa resistente.

4.3.1 Critérios de inclusão:

- Pacientes atendidos no Complexo de Saúde do Hospital Júlia Kubitschek (Unidades de emergência e internação ou Ambulatório de Pneumologia) e residentes no Estado de Minas Gerais;
- Idade maior de 18 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico presuntivo ou definitivo de TB;
- Concordância quanto à participação no estudo proposto, através do preenchimento do consentimento livre e esclarecido.

4.3.2 Critérios de exclusão

- Pacientes pertencentes a grupos especiais, com relação de dependência ou deficientes mentais;

4.3.3 Critérios de perda

- Pacientes que não coletaram amostra de escarro ou não apresentaram escarro para coleta;
- Amostras insuficientes ou inadequadas para estudo microbiológico ou molecular;
- Culturas de escarro negativas ou contaminadas.

4.4 Locais e estudos desenvolvidos

As instituições envolvidas neste trabalho e o tipo de estudo desenvolvido em cada uma delas, estão apresentados no Quadro 1.

QUADRO 1 - Instituições e estudos desenvolvidos

Instituição	Estudo desenvolvido
Hospital Júlia Kubitscheck (HJK) Rede FHEMIG, Belo Horizonte, MG	Fornecimento dos pacientes e amostras
Laboratório MICRA - Belo Horizonte, MG	Repique e congelamento das amostras PCR para <i>M. tuberculosis</i>
Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) - Laboratório de Micobactérias, Vitória, ES	Identificação das cepas, TS pelo sistema BACTEC 460 e determinação da CIM das cepas resistentes
Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, SP	Avaliação da atividade de pirazinamidase
Laboratório Central (LACEN) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e Centro de Desenvolvimento Científico (CDCT), Porto Alegre, RS	Estudo das mutações por sequenciamento gênico e RFLP
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) - Manguinhos, RJ	Estudo de mutação do gene <i>rpoB</i> através de <i>rifoligotyping</i>

O HJK é um hospital de cuidados terciários, público e com capacidade para 327 leitos, considerado centro de referência no Sistema Único de Saúde para atendimento de portadores de doenças respiratórias, e dentre essas, a TB. Durante o período de estudo foram notificados, pela instituição, 112 novos casos de TB pulmonar registrados com o código A-15 do Código Internacional de Doenças, ou seja, “*tuberculose respiratória, com confirmação bacteriológica e histológica*”. A média mensal registrada foi de oito casos. No HJK foi realizado busca ativa dos pacientes e fornecimento das amostras.

No Laboratório MICRA foram realizados o repique, identificação molecular de espécie *M. tuberculosis* e congelamento das amostras. É um estabelecimento particular, certificado pelo programa SENTRY de controle de qualidade e vigilância em microbiologia.

No Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) procederam-se às identificações das cepas, testes de sensibilidade às drogas pelo sistema BACTEC 460 e determinação da CIM das cepas resistentes. É referência para estudos de farmacologia e resistência às drogas, sendo credenciado pela Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose (REDE-TB).

O Laboratório Central (LACEN) e Centro de Desenvolvimento Científico (CDCT) é um departamento da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) vinculada à Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul (RS), e atua em pesquisa direcionada às ciências biológicas e de saúde. Seu objetivo é desenvolver tecnologias eficientes, modernas e mais baratas para servir à população da rede pública de saúde, especialmente no âmbito do Sistema Único de Saúde. Nesse centro realizou o RFLP e os estudos de mutação através do sequenciamento do DNA.

O Complexo de Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), constitui instituição de assistência, pesquisa e ensino. Contempla laboratório especializado em TB e outras micobacterioses. Nesse laboratório foi realizado estudo para avaliação de mutação referente à resistência à R.

O Instituto Adolfo Lutz avaliou a atividade de PZase nas cepas resistentes à Z. É laboratório de referência do Estado de São Paulo, um dos principais centros de pesquisa do país, sobretudo nas áreas de diagnóstico e epidemiologia molecular de micobacterioses.

4.5 Material

Amostras de secreção respiratória foram coletadas, utilizando-se técnicas não invasivas tais como escarro ou escarro induzido, e posteriormente descontaminadas e cultivadas em meio de Lowenstein Jensen (LJ) a 37°C. Após o crescimento, os tubos contendo colônias foram armazenados e posteriormente

encaminhados aos laboratórios supracitados para a realização das análises propostas neste estudo.

4.6 Método

4.6.1 Dinâmica da coleta e processamento do material

Todos os pacientes admitidos no HJK com suspeita de TB pulmonar foram localizados através de busca ativa da equipe, com visitas regulares de duas a três vezes por semana.

Pacientes não identificados na busca tiveram sua amostra biológica localizada no laboratório de microbiologia do HJK, sendo encaminhados para entrevista. As coletas de amostras biológicas e entrevistas com preenchimento do protocolo foram realizadas por equipe composta de dois médicos e quatro acadêmicos de graduação em Medicina.

Todas as amostras de secreção respiratória (escarro e escarro induzido) com baciloscopia e culturas positivas de pacientes com suspeita de resistência foram encaminhadas ao NDI para realização de TS pelo método radiométrico (BACTEC 460), com a determinação da CIM.

Cepas resistentes à Z foram também estudadas quanto à atividade da enzima PZase pelo método de Wayne (WAYNE, 1974), no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Todas as cepas identificadas como resistentes pelo TS radiométrico tiveram DNA extraído para o estudo de mutações e RFLP. Cepas resistentes às drogas H, Z e E foram estudadas pelo sequenciamento gênico para avaliação de mutações dos genes *inhA*, *ahpC*, *katG*, *pncA* e *embB*. A análise da frequência e do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de DNA gerados após digestão com enzimas de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) foi realizada para

definição de correlação epidemiológica. Esses testes foram executados no CDCT de Porto Alegre, RS.

As cepas resistentes também foram encaminhadas à Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro para avaliação de mutação preferencial relacionada à resistência a R (FIG. 10 e 11).

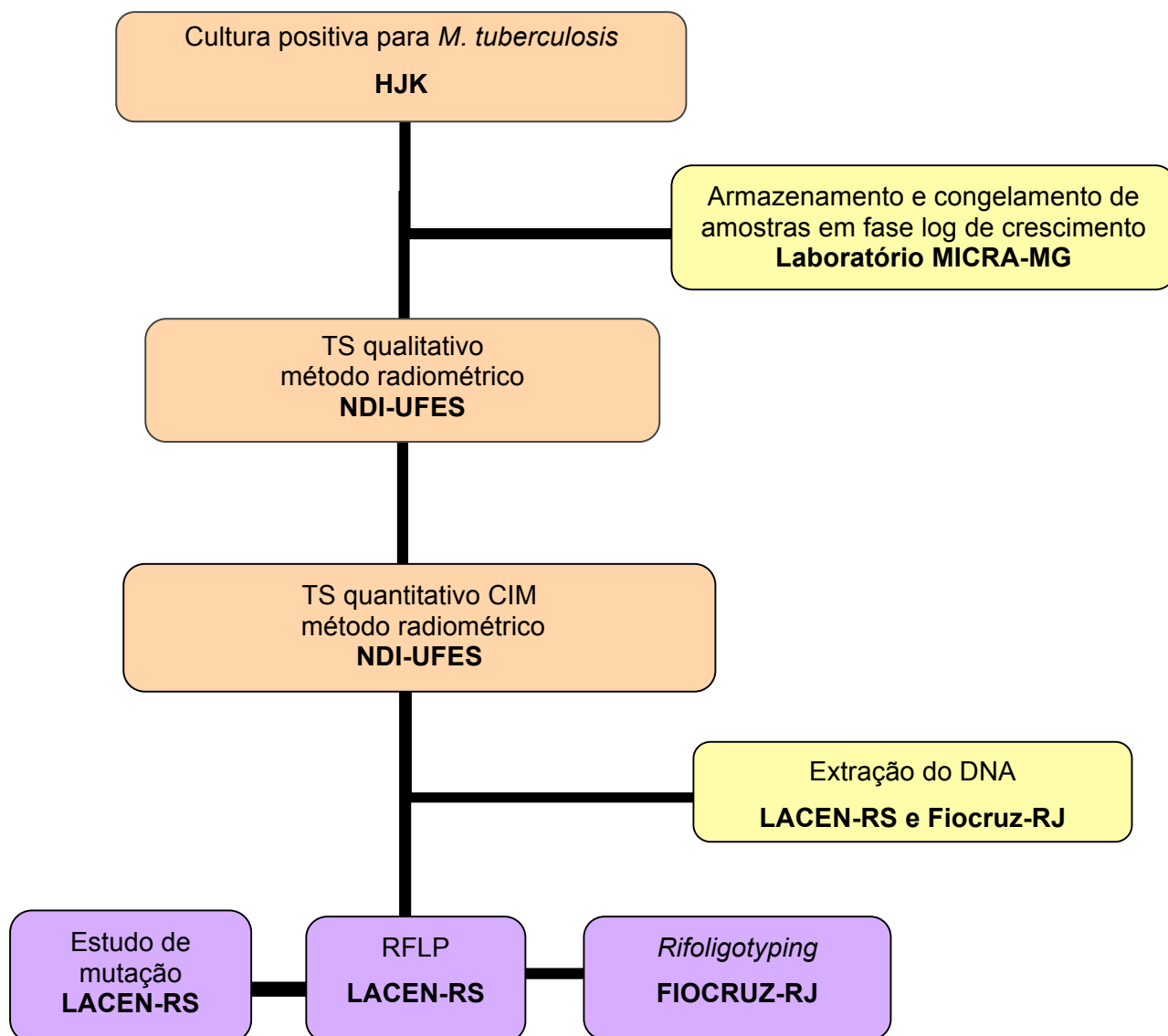


FIGURA 10 - Processamento da amostra

Nota: Teste de sensibilidade (TS); Concentração inibitória mínima (CIM); ácido desoxiribonucléico (DNA); Restriction fragment length polymorphism (RFLP); Hospital Júlia Kubistchek (HJK); Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo (NDI-UFES); Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN-RS); Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (FIOCRUZ -RJ)

Fonte: Dados do autor

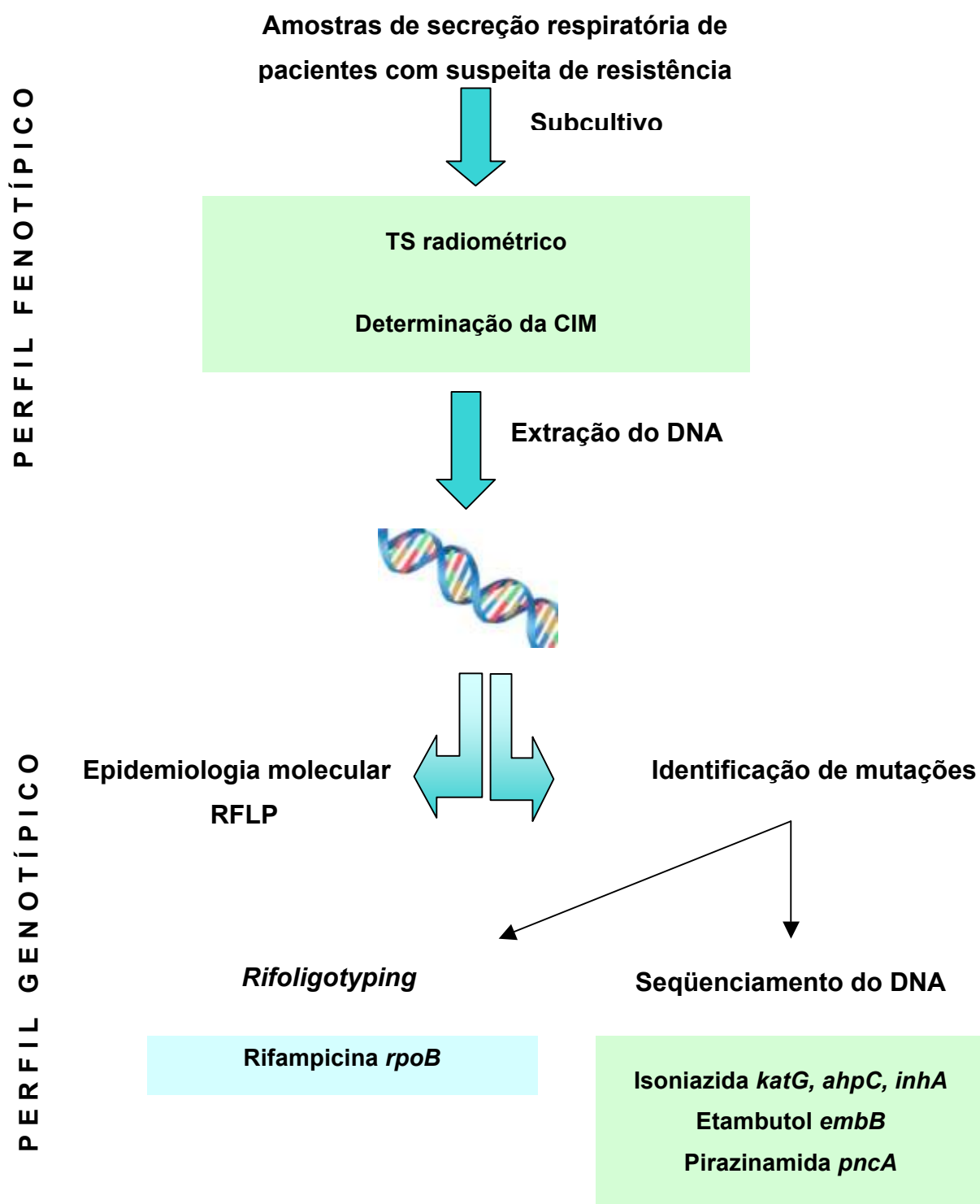


FIGURA 11 - Avaliação fenotípica e genotípica das cepas de *M. tuberculosis*

Nota: Teste de sensibilidade (TS); Concentração inibitória mínima (CIM); Ácido desoxiribonucléico (DNA); *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

4.6.1 Identificação das micobactérias isoladas

No NDI da UFES, as cepas selecionadas foram identificadas como *M. tuberculosis*, com base em suas características fenotípicas, tais como aspecto das colônias, tempo de crescimento, álcool-ácido resistência e, principalmente, considerando sua sensibilidade ao ácido *p*-nitrobenzóico (500µg/mL), *p*-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona (NAP) e resistência à hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (2µg/mL). O método NAP seguiu as recomendações do fabricante (Product and Procedure Manual, MA 0029, Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Sparks, MD, May 1996). (ANEXO A)

4.6.2 Testes de sensibilidade qualitativo a drogas anti-TB pelo sistema BACTEC 460

A determinação do perfil de sensibilidade às drogas anti-TB pelo sistema BACTEC 460, foi realizada no NDI, de acordo com as recomendações técnicas do fabricante (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Maryland USA) (ANEXO B).

4.6.3 Testes de sensibilidade quantitativo a drogas anti-TB pelo sistema BACTEC 460 (determinação da CIM)

Todas as cepas resistentes às drogas anti-TB no TS qualitativo tiveram a CIM determinada por TS quantitativo através do sistema BACTEC 460, conforme as recomendações do fabricante (ANEXO C). A estratificação da sensibilidade permitiu classificar as cepas, quanto ao nível de sensibilidade, em sensível, moderadamente sensível, moderadamente resistente e resistente, de acordo com HEIFETS (1988) e apresentado na TAB. 2. Os valores de corte do TS quantitativo para Z obedeceu aos critérios determinados pelo fabricante (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Maryland USA) e sugeridos por SALFINGER, HEIFETS em 1988.

TABELA 2 - Estratificação do teste de sensibilidade por método radiométrico.

Drogas	Categoria de sensibilidade			
	CIM (µg/mL)			
	Sensível	Moderadamente sensível	Moderadamente resistente	Resistente
Isoniazida	≤ 0,1	0,2-1,0	2,0	≥ 4,0
Rifampicina	≤ 0,5	1,0-4,0	8,0	≥ 16
Pirazinamida	≤ 100	300	900	>900
Etambutol	≤ 2,0	4,0	8,0	≥ 16
Estreptomicina	≤ 2,0	4,0	8,0	≥ 16

Nota: CIM: concentração inibitória mínima.

Fonte: HEIFETS, 1988; SALFINGER, HEIFETS 1988, modificado.

4.6.4 Prova da pirazinamidase (PZase)

A atividade da enzima Pzase das cepas Z resistentes foi determinada pelo método de Wayne (WAYNE, 1974). O teste foi realizado no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (ANEXO D).

4.6.5 Testes moleculares

Em seguimento ao estudo fenotípico, foram realizados os testes moleculares (FIG.11, 12 e 13). Para execução desses testes, o DNA cromossomal de todas as cepas foi extraído por técnica utilizando o brometo de cetiltrimetamônio (CTAB). A técnica empregada foi descrita por van EMBDEN *et al.* (1993) e modificada por van SOOLINGEN *et al.* (1994). O DNA das amostras foi utilizado para realização do RFLP, *rifoligotyping* e sequenciamento.

4.6.5.1 RFLP

Todas as cepas resistentes tiveram o DNA cromossomal extraído e digerido por enzima de restrição *Pvu* II, isolada de *Proteus vulgaris*. Os fragmentos gerados

foram separados por eletroforese em gel de agarose, transferidos e fixados à membrana de nylon. Posteriormente, foram hibridizados utilizando como sonda, um fragmento de 245 pb, contendo parte correspondente à sequência de inserção 6110, situado à direita do sítio de clivagem da enzima (van EMBDEN *et al.*, 1992), conforme apresentado na FIG.12.

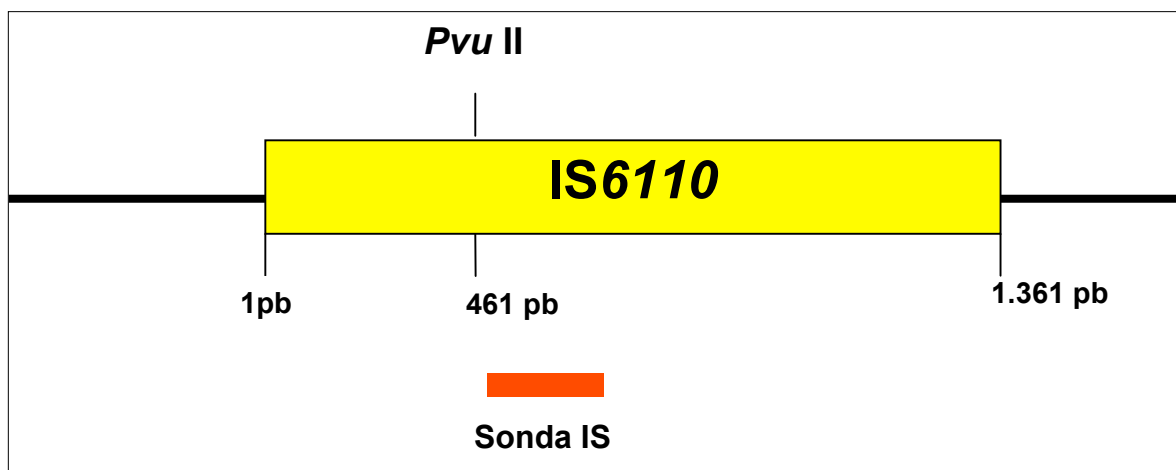


FIGURA 12 - Mapa físico da sequência de IS6110 de *M. tuberculosis*.

Nota: Sonda de 245 pares de base, à direita do sítio de clivagem da enzima *Pvu II*. As linhas à direita e à esquerda representam o DNA cromossomal.

Fonte: van EMBDEN *et al.*, 1992, p.385.

A detecção dos fragmentos foi obtida pela sensibilização de filme auto-radiográfico através de reação de quimioluminescência. O número e tamanho dos fragmentos de DNA cromossomal que hibridizaram com o IS6110 permitem a análise comparativa dos padrões eletroforéticos e caracterização do perfil genético, através do programa de computador Gel Compar versão 4.2 (*Applied Maths* Bélgica), seguindo recomendações de TENOVER *et al.*, 1997 (FIG.13).

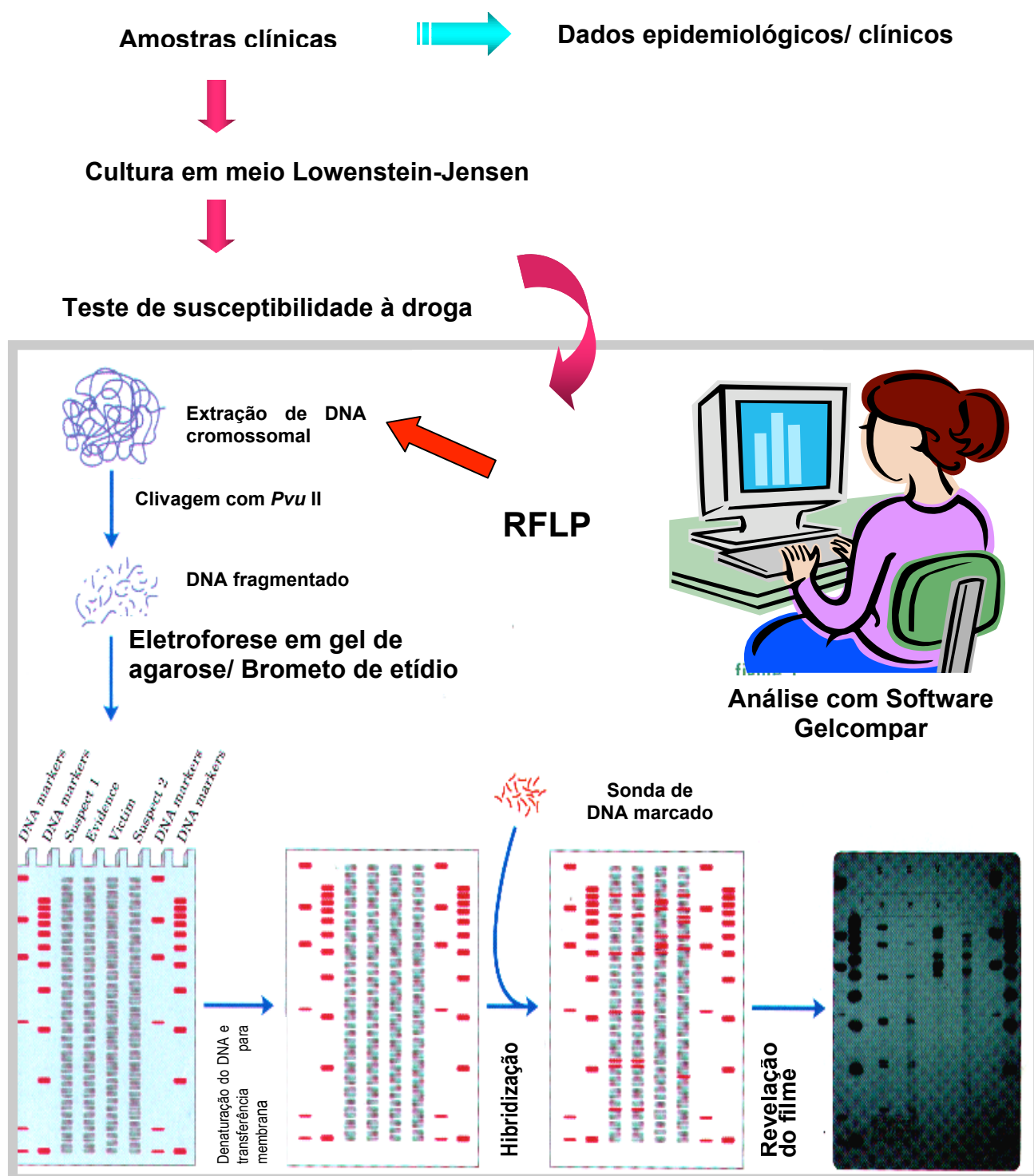


FIGURA 13 - Epidemiologia Molecular / *Fingerprinting* (RFLP)

Nota: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP); Ácido desoxiribonucléico (DNA); enzima de clivagem *Pvu II* (*Pvu II*)

Para interpretação, considerou-se que isolados com padrão de RFLP distinto não seriam pertencentes ao mesmo *cluster*, salvo correlação epidemiológica de forte evidência. A técnica descrita seguiu protocolo relatado por van EMBDEN *et al.*, 1993 (ANEXO E).

4.6.5.2 Análise genômica para detecção de mutações associadas à resistência à isoniazida, pirazinamida e etambutol por sequenciamento automático do DNA

As cepas resistentes à H, Z e E tiveram o DNA seqüenciado nas regiões correspondentes a mutações gênicas associadas à resistência (ANEXO F). Para tal foram utilizados:

a) *Primers*: para amplificar a região promotora dos genes estudados, foram construídas sequências específicas de DNA iniciadoras (*primers*) baseadas em regiões dos genes associados com a resistência à H, Z e E, do genoma do *M. tuberculosis* (acesso no GenBank AL123456). A descrição completa dos iniciadores para amplificação desses genes (*katG*, *inhA*, *ahpC*, *pncA* e *embB*) foi apresentada nos estudos de SILVA *et al.*, 2003 e RODRIGUES *et al.*, 2005.

b) Reação de PCR: a reação de PCR, para a obtenção dos produtos destinados às análises moleculares, foi realizada em um termociclador (*MiniCyclerTM – Hot Bonnet PTC – 150 / MJ Research*). A amplificação dos fragmentos foi padronizada em 2 min a 94°C, 1 min a 55°C e 2 min a 72°C durante 30 ciclos.

c) Detecção dos produtos amplificados por PCR: os produtos da amplificação da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, e detectados em transluminador de ultravioleta (UV). O marcador de peso molecular utilizado durante as corridas eletroforéticas foi 100 pb DNA *Ladder* (Gibco-BRL).

d) Sequenciamento automático: A região dos genes e as regiões regulatórias dos genes envolvidos com a resistência a drogas anti-TB foram analisadas por sequenciamento automático, usando-se o produto de PCR diretamente. As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit *Taq Dye Deoxy terminator cycle sequencing kit* (Applied Biosystems Inc.), utilizando-se o produto amplificado e *primers* para cada gene estudado.

4.6.5.3 Análise genômica para detecção de mutação associada à resistência à rifampicina por rifoligotyping (PCR reverse line blot hybridization)

Nesta técnica, a região correspondente ao gene *rpoB* foi amplificada por PCR, utilizando-se *primer* biotinilado, resultando em fragmento do DNA marcado por biotina como produto do PCR. Posteriormente, esse produto foi hibridizado com sondas de cepas selvagens e mutantes que foram covalentemente ligadas à membrana através do *reverse line blotting*. Cepas que apresentaram mutação codificadora de resistência foram identificadas por hibridização, sendo detectadas em radiografia após incubação com avidina-estreptavidina, revelada por quimioluminescência. Cepas sensíveis à R hibridizaram apenas com sondas de cepas selvagens, enquanto cepas mutadas hibridizaram com sondas que codificam mutantes. A técnica está apresentada no ANEXO G, sendo adotada pelo *National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, Netherlands* e pelo Laboratório de Micobacteriologia da Fiocruz, RJ.

4.6.6 Análise dos resultados

Os dados recolhidos na forma de questionário (ANEXO H) foram transferidos para o banco de dados do programa EpiData e analisados pelo programa Epi-Info 2002, versão 3.2.2 para programa Windows.

A avaliação das variáveis categóricas foi feita através do teste qui-quadrado (χ^2) com correção Yates. Em todos os testes fixou-se em 5% o nível de rejeição da hipótese nula ($p \leq 0,05$).

4.6.7 Considerações

O projeto do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (no. 072 e no. 215) e pela Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 039/04), incluindo as Câmaras Departamentais dos Departamentos de Clínica Médica e Propedêutica Complementar, às quais pertencem os pesquisadores envolvidos. Além disso, obteve-se carta de compromisso do Hospital Júlia Kubitschek, Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES, Laboratório MICRA, LACEN RS, Fiocruz- RJ e Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, instituições que aprovaram e participaram do estudo.

A pesquisa bibliográfica foi realizada a partir de consulta à base de dados Medline, compilada pela *National Library of Medicine*, dos Estados Unidos da América, disponível na internet. Utilizando-se de estratégias de busca a partir de palavras chave, foram procurados artigos indexados nas áreas de interesse. Outras referências de interesse foram obtidas em livros especializados, teses e livros de resumos de eventos científicos.

A estrutura da dissertação seguiu as orientações do Manual para normalização de publicações técnico científicas e as referências foram organizadas e citadas de acordo com as regras da Associação Brasileira de Normas Técnicas (FRANÇA, VASCONCELLOS, 2004).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos pacientes

Dos 160 pacientes com diagnóstico presuntivo ou definitivo de TB pulmonar, 76 apresentaram suspeita clínica ou microbiológica de resistência. Após realização do TS, identificaram-se 24 pacientes portadores de cepas resistentes a pelo menos uma droga anti-TB estudadas. As principais características clínico-epidemiológicas dos pacientes encontram-se na TAB. 3.

Os 24 pacientes portadores de cepas resistentes apresentaram idade mediana de 39,7 anos (mínima: 24 anos e máxima: 68 anos; desvio padrão: 11,7 anos), sendo 16 do sexo masculino (67%) e 8 do sexo feminino (33%). A maioria dos pacientes (96%) era de origem urbana, sendo 12 (50%) moradores de Belo Horizonte. Sete pacientes residiam na região metropolitana, incluindo-se os municípios de Contagem, Ibirité, Mateus Leme e Raposos. Outros cinco pacientes residiam nas cidades de Itutinga, Ouro Branco, São Gonçalo do Pará, São João Del Rey e Timóteo. A FIG. 14 apresenta o mapa da região metropolitana de Belo Horizonte, indicando as regiões de origem dos pacientes portadores de cepas resistentes.

TABELA 3 Características clínico-epidemiológicas dos 24 pacientes portadores de cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*, Hospital Júlia Kubitschek, janeiro de 2001 a janeiro de 2002

	24 pacientes com Tuberculose pulmonar resistente	
	N (1)	% (2)
Sexo		
Masculino	16	67
Feminino	8	33
Procedência		
Belo Horizonte	12	50
Outras cidades	12	50
História de contato		
Domiciliar	2	8
Ocupacional	1	4
Hospitalar	1	4
Sem contato	8	33
Ignorado	12	50
Comorbidades		
Alcoolismo	11	46
Tabagismo	13	54
HIV positivo	0	0
Diabetes	1	4
Neoplasia	0	0
Silicose	1	4
História prévia de tuberculose (3)	19	79
Sintomas		
Tosse	20	83
Emagrecimento (3)	14	58
Febre	13	54
Dispnéia	14	58
Sudorese noturna	12	50
Astenia	9	37
Dor torácica	7	29
Hemoptise	2	8
Radiografia do tórax		
Cavitações	12	50
Pulmão destruído	6	25
Consolidação (3)	1	4
Outras alterações	3	12
Ignorada	2	8
Tratamento prévio (3)	19	79
Evolução clínica		
Melhora esquema 1 e 1R	4	17
Melhora esquema 3	1	4
Melhora esquema para TB-MDR (3)	9	37
Piora com esquema para TB-MDR	1	4
Melhora sem uso de tuberculostáticos	1	4
Abandono	4	17
Óbito	2	8
Ignorada	2	8

Nota: (1) N = número de pacientes; (2) % = porcentagem dos valores válidos; (3) variáveis que apresentaram diferença com significância estatística, quando comparados os 52 pacientes sem cepas resistentes com os 24 pacientes portadores de cepas resistentes. TB-MDR: tuberculose multidroga resistente.

Fonte: Dados do autor

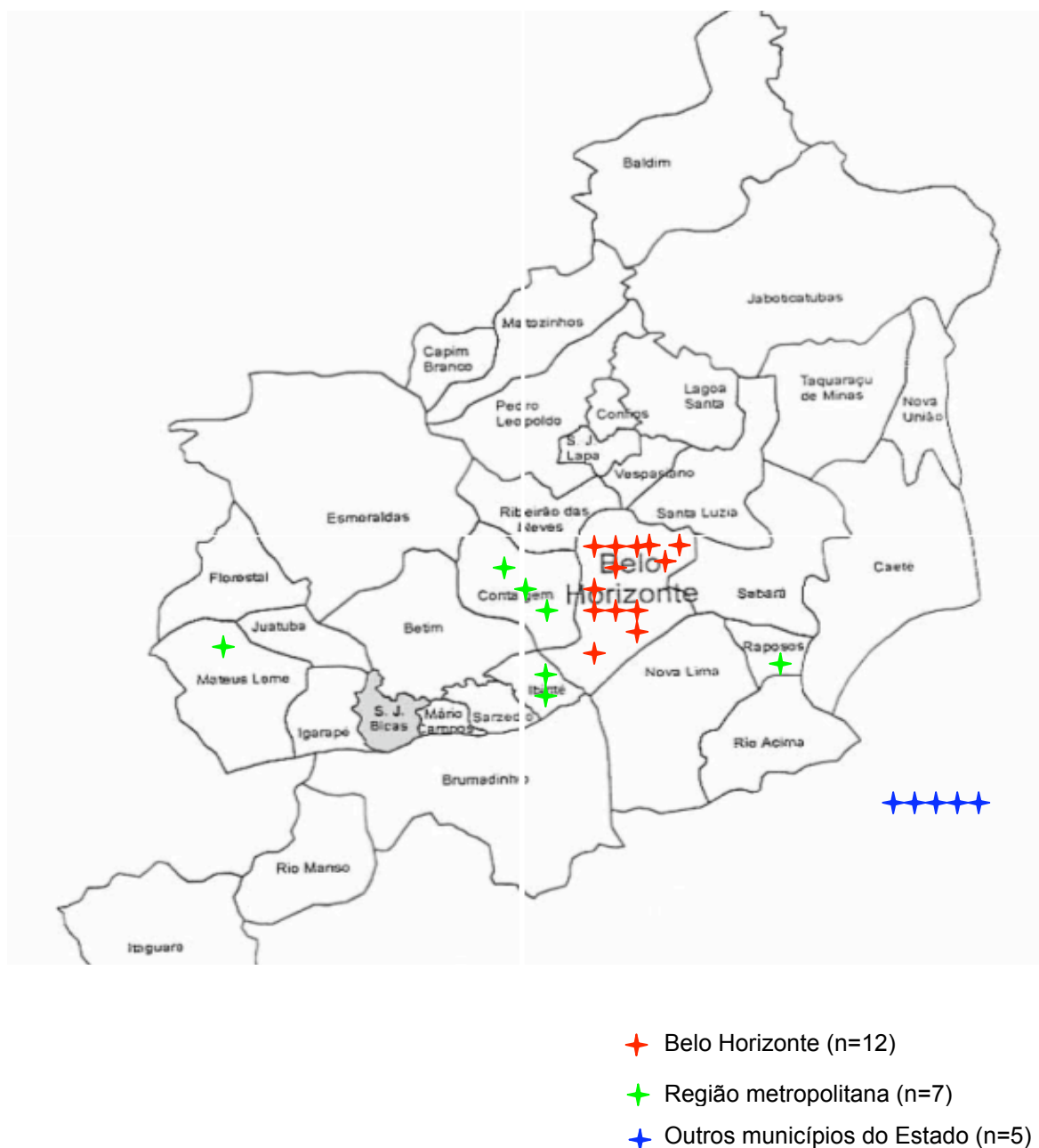


FIGURA 14 - Distribuição geográfica dos 24 pacientes portadores de cepas resistentes na região metropolitana de Belo Horizonte

Fonte: Dados do autor

Em relação ao tipo de habitação, 23 pacientes (96%) tinham residência fixa (casa, apartamento ou barraco) e apenas um era “sem teto”, morador de casa de apoio ou albergue. Informações sobre o grau de escolaridade foram obtidas para 11 pacientes (46%), sendo um analfabeto (4%), oito (33%) tendo concluído o ensino fundamental (1º grau) e dois (8%) o ensino médio (2º grau).

Quatro pacientes (19%) informaram história de contato com portadores de TB, sendo um através de contato ocupacional, dois através de contato domiciliar e um contato hospitalar.

Das comorbidades avaliadas, as mais frequentes foram tabagismo (13 pacientes; 54%) e alcoolismo (11 pacientes; 46%). A sorologia anti-HIV foi obtida em 20/24 pacientes, sendo negativa em todos os casos avaliados.

As principais manifestações clínicas relatadas foram tosse (83%), dispnéia (58%), emagrecimento (58%) e febre (54%). As alterações radiográficas mais frequentes foram cavitações unilaterais ou bilaterais (50%).

Dos 24 pacientes portadores de cepas resistentes, 23 informaram sobre episódio prévio de TB, sendo que desses, 19 confirmaram TB pulmonar e quatro negaram passado de TB. O número de episódios de TB pulmonar anteriores variou de um a cinco ou mais, sendo desconhecido em dois pacientes que não souberam quantificar o número de episódios prévios. A TAB. 4 apresenta a comparação do número de episódios prévios de TB pulmonar dos pacientes portadores de cepas resistentes com o total de pacientes incluídos no estudo. Os 24 pacientes que apresentaram maior frequência de TB prévia também apresentam maior número de episódios. Em relação ao uso de drogas anti-TB, constata-se que 19 dos 24 pacientes fizeram uso dessas drogas e o número de tratamentos prévios variou de um a dez. Os dois pacientes que não informaram o número de episódios prévios de TB pulmonar também não sabiam precisar o número de tratamentos anteriores.

No grupo de 24 pacientes com cepas resistentes, a evolução do primeiro tratamento prévio foi estabelecida nos 19 pacientes com história anterior de TB, sendo que, destes, um completou com cura e quatro sem cura, 13 abandonaram o tratamento e um paciente permanecia em uso de drogas anti-TB e persistia com baciloscopia positiva (TAB. 5).

TABELA 4 - Número de diagnósticos prévios de TB pulmonar nos 24 pacientes com TB pulmonar resistente

HISTÓRIA PRÉVIA DE TUBERCULOSE PULMONAR	Pacientes com TB pulmonar resistente	
	N (1)	% (2)
1 vez	5	20,8
2 vezes	4	16,7
3 vezes ou mais	8	33,3
Número de vezes ignorado	2	8,3
Sem passado de TB pulmonar	4	16,7
Ignorada	1	4,2
TOTAL	24	100,0

Nota: (1) N = número de casos; (2) % = porcentagem.

Fonte: Dados do autor

TABELA 5 - Evolução clínica dos 19 pacientes portadores de cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* com história de tuberculose pulmonar prévia e submetidos a tratamento anterior.

Evolução	1º tratamento	2º tratamento	3º tratamento
	N (%)	N (%)	N (%)
Completo com cura	1 (5,2)	-	1 (12,5)
Completo sem cura	4 (21,1)	-	-
Abandono de tratamento	13 (68,5)	10 (83,3)	7 (87,5)
Em seguimento	1 (5,2)	2 (16,6)	-
TOTAL	19 (100)	12 (100)	8 (100)

Nota: N = número de casos; % = porcentagem dos números válidos.

Fonte: Dados do autor

5.2 Caracterização fenotípica das cepas de *M. tuberculosis* por método qualitativo e quantitativo para as drogas anti-TB

5.2.1 Perfil de sensibilidade qualitativo das cepas de *M. tuberculosis*

Os resultados dos testes de sensibilidade radiométrico qualitativo às drogas anti-TB (R, H, Z, E, S), encontram-se descritos na TAB. 6. Das 24 amostras estudadas, 21 (87,5%) foram resistentes à H, 17 (70,8%) à R, 13 (54,2%) à S e 10 (41,7%) ao E. Detectou-se resistência à Z em 10 das 23 cepas (43,5%), devido à não recuperação de uma cepa em subcultivo.

TABELA 6 - Teste de sensibilidade qualitativo às drogas anti-TB

Droga	Sensível		Resistente		TOTAL
	N	%	N	%	
H	3	12,5%	21	87,5%	24
R	7	29,2%	17	70,8%	24
S	11	45,8%	13	54,2%	24
E	14	58,3%	10	41,7%	24
Z	13	56,5%	10	43,5%	23*

Nota: isoniazida (H); rifampicina (R); estreptomicina (S); etambutol (E); pirazinamida (Z); * teste de sensibilidade para Z não foi realizado em uma cepa, devido a não recuperação em subcultivo.

Fonte: Dados do autor

Das 24 amostras, 17 foram consideradas MDR, de acordo com critério da OMS. A TAB. 7 apresenta a avaliação combinada das cepas resistentes à R e H perante as demais drogas.

TABELA 7 - Avaliação combinada de testes de sensibilidade a drogas: perfil de cepas de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida e/ou rifampicina testados em relação a outras drogas

Drogas	Sem resistência adicional	Resistência adicional							Total
		Z	E	S	E S	Z S	Z E	Z E S	
H	1	0	1	1	0	0	0	1	4
R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R + H	7	1	1	0	1	1	0	6	17

Nota: isoniazida (H); rifampicina (R); estreptomicina (S); etambutol (E); pirazinamida (Z)

Fonte: Dados do autor

Vinte e uma cepas foram resistentes à H, dessas, quatro não apresentaram resistência combinada para R, apesar de apresentarem resistência à Z, S e E. Das dezessete cepas resistentes à R e H, sete não apresentaram resistência adicional a nenhuma outra droga testada e seis cepas foram resistentes a todas as drogas testadas. Todas as cepas resistentes à R também foram resistentes à H.

5.2.2 Perfil de sensibilidade quantitativo das cepas de *M. tuberculosis*

A TAB. 8 apresenta a distribuição estratificada do TS quantitativo por droga, baseado nos resultados da CIM. As cepas resistentes que não tiveram a CIM determinada não foram recuperadas em subcultivos.

TABELA 8 - Distribuição estratificada dos testes de sensibilidade quantitativos

Droga	TS quantitativo					TOTAL
	Não realizado	S	MS	MR	R	
Isoniazida	3	-	2 (11,2%)	-	16 (88,8%)	21
Rifampicina	3	-	4 (28,6%)	-	10 (71,4%)	17
Pirazinamida	2	-	3 (37,5%)	-	5 (62,5%)	10
Etambutol	2	-	-	1 (12,5%)	7 (87,5%)	10
Estreptomicina	2	5 (45,5%)	-	-	6 (54,5%)	13

Nota: isoniazida (H); rifampicina (R); estreptomicina (S); etambutol (E); pirazinamida (Z)

Fonte: Dados do autor

5.2.3 Correlação entre teste de sensibilidade das cepas e uso prévio da droga

Dezessete pacientes (70,8%) informaram as drogas usadas em tratamentos anteriores, sendo que todos utilizaram H, R e Z. O E foi usado em 13 (54,2%) pacientes, e a Et e S em 11 (45,8%) pacientes.

Considerando-se o perfil de susceptibilidade com a prévia exposição à droga, tem-se para a H que 84,2% (16/19) das cepas resistentes estavam associadas ao uso prévio deste fármaco. Para a R, Z, E e S, os valores foram de 87,5% (14/16), 100,0% (9/9), 87,5% (7/8) e 60,0% (6/10) de exposição prévia, respectivamente. Contudo, não se observa diferença com significância estatística em relação ao TS qualitativo entre aqueles expostos ou não às drogas previamente. A TAB. 9 apresenta a distribuição das cepas estudadas em relação ao perfil de sensibilidade determinado pelo TS e o uso prévio de cada droga. Não foi possível recuperar uma cepa, havendo a perda de um TS para Z.

TABELA 9 - Distribuição das 24 cepas em relação ao teste de sensibilidade e uso prévio de droga anti-TB.

Uso prévio da droga	Teste de sensibilidade			
	Sensível	Resistente	Total	p
Isoniazida				
Sim	1	16	17	0,35
Não	1	3	4	
ignorado(*)	1	2	3	
Total	3	21	24	
Rifampicina				
Sim	3	14	17	0,23
Não	2	2	4	
ignorado(*)	2	1	3	
Total	7	17	24	
Pirazinamida				
Sim	8	9	17	0,22
Não	3	0	3	
ignorado(*)	2	1	3	
Total	13	10	23 (**)	
Etambutol				
Sim	6	7	13	0,16
Não	6	1	7	
Ignorado(*)	2	2	4	
Total	14	10	24	
Estreptomicina				
Sim	5	6	11	1,0
Não	5	4	9	
ignorado(*)	1	3	4	
Total	11	13	24	

Nota: isoniazida (H); rifampicina (R); estreptomicina (S); etambutol (E); pirazinamida (Z); (*) pacientes que não souberam informar sobre o uso prévio da droga; (**) uma cepa não teve o TS para pirazinamida determinado devido a não recuperação em subcultivo.

Fonte: Dados do autor

5.2.4 Correlação entre teste de sensibilidade das cepas e evolução clínica dos pacientes

A evolução clínica dos pacientes foi avaliada, após 18 meses, por revisão de 22 (91,6%) prontuários. Em dois pacientes (9,0%) ocorreu melhora clínica com uso do esquema 1 (RHZ), em outros dois com esquema 1R (RHZE) e em um com esquema 3 (SEEtZ). Em nove pacientes ocorreu melhora clínica com esquema para TB-MDR, com amicacina (A), E, ofloxacina (OfI), terizidona (Trz) e clofazimina (Cfz). Um paciente piorou, a despeito do tratamento para TB-MDR. Ocorreram dois óbitos, sendo um não relacionado com a doença. Um paciente apresentou melhora clínica sem uso de drogas anti-TB e quatro pacientes abandonaram o tratamento na instituição.

A TAB. 10 apresenta a avaliação do teste de sensibilidade em relação à evolução do tratamento. Observa-se que a maioria dos pacientes portadores de cepas resistentes melhorou com o esquema para o tratamento da TB-MDR e que, nessa amostragem, a taxa de abandono ocorreu em cerca de 18,0% dos casos.

TABELA 10 - Avaliação do teste de sensibilidade às drogas anti-TB de acordo com a evolução clínica.

Evolução clínica	Teste de sensibilidade														
	Isoniazida			Rifampicina			Pirazinamida			Etambutol			Estreptomicina		
	S	R	Total	S	R	Total	S	R	Total	S	R	Total	S	R	Total
Melhora com esquema 1	1	1	2	2	---	2	1	---	1	1	1	2	1	1	2
Melhora com esquema 1R	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2	---	2	1	1	2
Melhora com esquema 3	1	---	1	1	---	1	1	---	1	1	---	1	---	1	1
Melhora com esquema TB-MDR	---	9	9	1	8	9	4	5	9	4	5	9	4	5	9
Piora com esquema TB-MDR	---	1	1	---	1	1	1	---	1	1	---	1	1	---	1
Abandono	---	4	4	---	4	4	2	2	4	2	2	4	2	2	4
Óbito	---	2	2	---	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2
Melhora sem droga anti-TB	---	1	1	---	1	1	1	---	1	1	---	1	1	---	1
Total (%)	3 (13,6)	19 (86,4)	22 (100)	5 (22,7)	17 (77,3)	22 (100)	12 (57,1)	9 (42,9)	21 (100)	13 (59,1)	9 (40,9)	22 (100)	11 (50)	11 (50)	22 (100)

Nota: sensível (S); resistente (R); Esquema 1: RHZ; Esquema 1R: RHZE; Esquema 3: SEEtZ; Esquema TB-MDR: Amicacina, Etambutol, Ofloxacina, Terizidona, Clofazimina (AEOflTrzCfz). A evolução clínica foi ignorada para dois pacientes.

Fonte: Dados do autor

5.3 Caracterização genotípica das cepas

5.3.1 Análise do polimorfismo de DNA

Os 24 isolados foram genotipados pela técnica de RFLP. Nenhuma cepa apresentou padrão de RFLP similar. A FIG.15 apresenta a autoradiografia de membrana de transferência de *Southern blot* do RFLP, demonstrando os padrões encontrados.

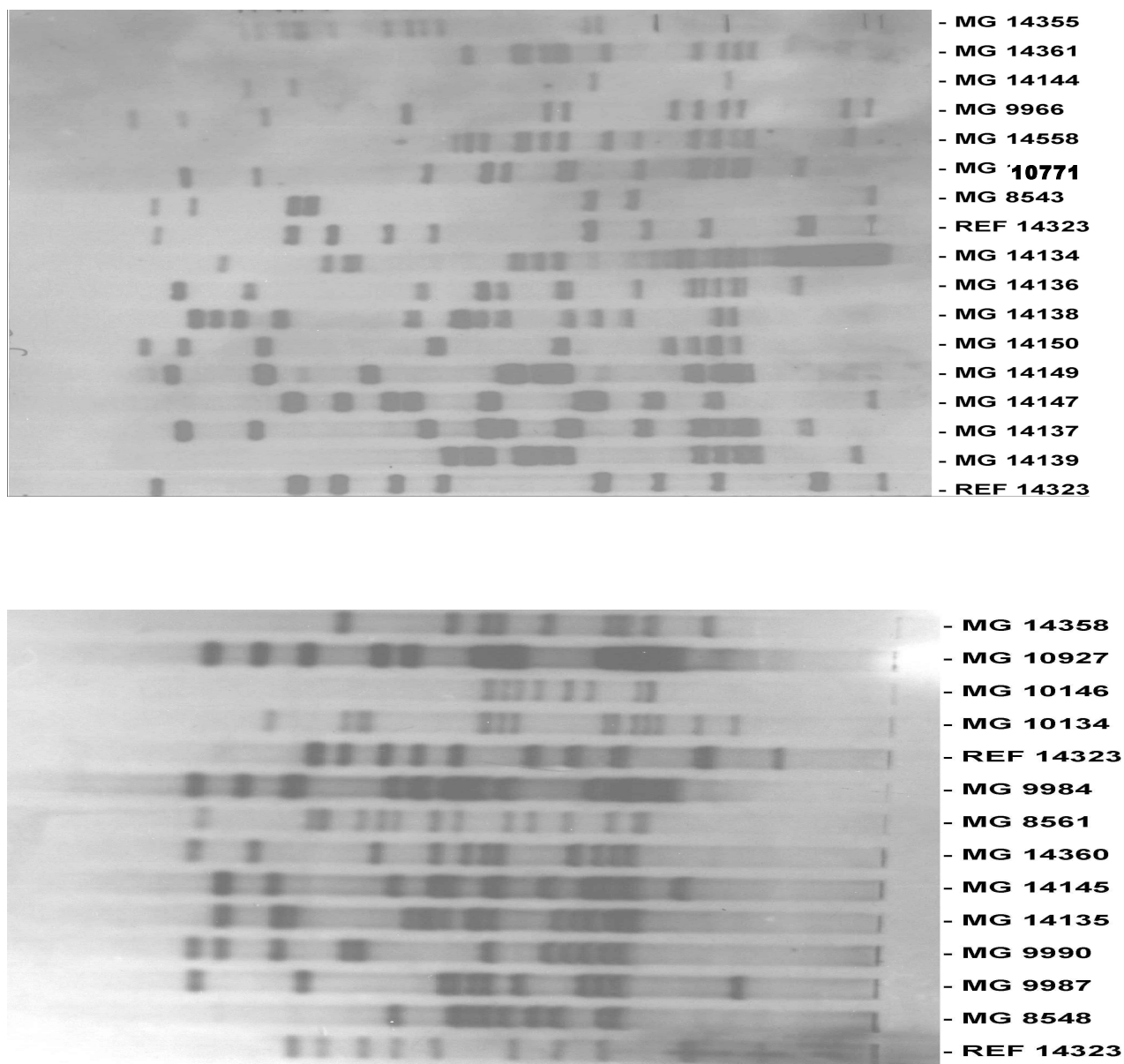


FIGURA 15 - Autoradiografia de membrana de transferência do *Southern blot*

Nota: As linhas apresentam os DNA's extraídos dos isolados de *M. tuberculosis*, obtidos após hibridação utilizando como sonda um fragmento de 245 pares de base, contendo parte do IS6110. O DNA da cepa de referência 14323 foi utilizado como marcador. As cepas 10771 e 14137 pertencem ao mesmo paciente. Foram incluídas duas cepas sensíveis: 14360 e 14145. A cepa 14142 não está incluída na figura.

Fonte: Dados do autor.

5.3.2 *Análise de mutações gênicas e correlação com resistência quantitativa às drogas anti-TB*

Para todas as cepas resistentes às drogas anti-TB, salvo aquelas em que não houve crescimento após repiques sucessivos, foi determinado o nível de resistência através da CIM e esses valores foram confrontados com as mutações gênicas identificadas.

5.3.2.1 Isoniazida

Das 24 cepas resistentes a qualquer droga anti-TB testada, 21 foram resistentes à H (87,5%) e, destas, 20 foram estudadas através de sequenciamento gênico para as mutações *katG*, *ahpC* e *inhA*. Durante repiques, para realização dos testes, foram excluídas três cepas (14136, 14134, 14142) devido ao não crescimento em subcultivos. Esse fato resultou no comprometimento de duas CIM e de um estudo de mutação.

Das 20 cepas em que foi realizado sequenciamento, 15 apresentaram mutação para *katG* (75,0%) e, destas, 14 (70,0%) apresentaram mutação no códon 315, com a substituição do nucleotídeo guanina por citosina, resultando na troca do aminoácido serina (Ser) por treonina (Thr). Uma cepa (5,0%) apresentou mutação na posição 299, com substituição de adenina por guanina, resultando na troca do aminoácido serina (Ser) por glicina (Gly). As mutações encontram-se descritas na TAB. 11.

TABELA 11 - Mutações do gene *katG* associadas à resistência à isoniazida

Códon	Alteração	Total de cepas	Nº de identificação das cepas
315	AGC(Ser) → ACC(Thr) S315T	14	8543, 8548, 9966, 9984, 9987, 10927, 14134, 14136, 14137, 14139, 14146, 14150, 14358, 14361
299	AGC(Ser) → GGC(Gly) S299G	1	14147

Nota: Serina (Ser); Treonina (Thr); Glicina (Gly)

Fonte: Dados do autor

A maioria das cepas com mutação do *katG* (92,3% ou seja 12/13) apresentaram CIM >4 µg/mL. Nas cepas H resistentes *katG* negativas houve predominância de resistência com CIM >4 µg/mL (80% ou seja 4/5), conforme apresentado na TAB. 12.

TABELA 12 - Avaliação comparativa entre teste de sensibilidade qualitativo e quantitativo para isoniazida e mutação do gene *katG*

Mutação <i>katG</i>	Teste qualitativo						Total
	S	R					
		Teste quantitativo (CIM)					
		S	MS	MR	R	Não realizado	
Presente	-	-	1	-	12	2	15
Ausente	-	-	1	-	4	...	5
Não realizado	3	...	...	...	...	1	4
Total	3	-	2	-	16	3	24

Nota: sensível (S); moderadamente sensível (MS); moderadamente resistente (MR); resistente (R); concentração inibitória mínima (CIM)

Fonte: Dados do autor

Para o gene *oxyR-ahpC*, foram identificadas quatro cepas mutantes, em posições distintas do gene e 16 cepas sem mutações. As mutações identificadas no gene *oxyR-ahpC* estão apresentadas na TAB. 13.

TABELA 13 - Mutações do gene *ahpC* associadas à resistência à isoniazida

Posição	Alteração	Total de cepas	Cepas
- 9	(Gly) → (Ala)	1	14147
-12	(Cys) →(Thr)	1	14355
-30	(Cys) →(Thr)	1	9990
-39	(His) →(Tyr)	1	14135

Nota: Glicina (Gly); Alanina (Ala); Cisteína (Cys); Treonina (Thr); Histidina (His); Tirosina (Tyr)

Fonte: Dados do autor

Todas as mutações foram localizadas em porção regulatória do gene, entre a posição (-9) e (-39), conforme apresentado na TAB. 13. Nas cinco cepas *katG* negativas, três (60,0%) apresentaram mutação no *ahpC*. Em uma cepa foi observada associação de mutação do *katG* e *ahpC*. Duas cepas (14138 e 14149) não apresentaram mutação para os genes e regiões pesquisadas, incluindo-se o gene *inhA*.

A avaliação comparativa entre TS quantitativo e mutação do *ahpC* encontra-se na TAB. 14. A maioria das cepas com e sem mutação do gene apresentaram CIM na categoria de resistente.

TABELA 14 - Avaliação comparativa entre o teste de sensibilidade qualitativo e quantitativo para isoniazida e mutação do gene *ahpC*

Mutação <i>ahpC</i>	Teste qualitativo						Total
	S	R					
		Teste quantitativo (CIM)					
		S	MS	MR	R	Não realizado	
Presente	-	-	1	-	3	...	4
Ausente	-	-	1	-	13	2	16
Não realizado	3	...	...	...		1	4
Total	3	-	2	-	16	3	24

Nota: sensível (S); moderadamente sensível (MS); moderadamente resistente (MR); resistente (R) ; concentração inibitória mínima (CIM).

Fonte: Dados do autor.

Para o gene *inhA*, não foram identificadas mutações em nenhuma das 20 cepas resistentes à isoniazida testadas.

5.3.2.2 Rifampicina

Foram identificadas, pelo TS qualitativo, 17 cepas resistentes à R. Durante subcultivos não foi possível a recuperação de três cepas (14136, 14139, 14134), sendo realizados 14 TS quantitativos. Do total de cepas com determinação da CIM, quatro apresentaram níveis de 1 µg/mL a 4 µg/mL, enquanto dez exibiram CIM ≥ 16 µg/mL. As 14 cepas resistentes à R foram avaliadas através de ribotipagem para identificação de mutação do gene *rpoB* (FIG.16). Destas, oito cepas apresentaram substituição de nucleotídios na posição 531, sendo que em seis houve substituição de serina (Ser) por leucina (Leu) e em duas pelo triptofano (Trp). Em três cepas foi identificada mutação não localizada no códon 531. Desse modo, o *rpoB* identificou 78,6% (11/14) das cepas R resistentes. Outras três cepas não apresentaram mutação no gene *rpoB* (TAB.15). Devido a não recuperação das cepas 9987/14151, 14134 e 8548 não foi possível realizar a ribotipagem até a conclusão deste estudo. Contudo, na maioria das cepas resistentes cuja mutação ocorreu no códon preferencial 531, observou-se CIM ≥16 µg/mL (TAB. 15 e 16).

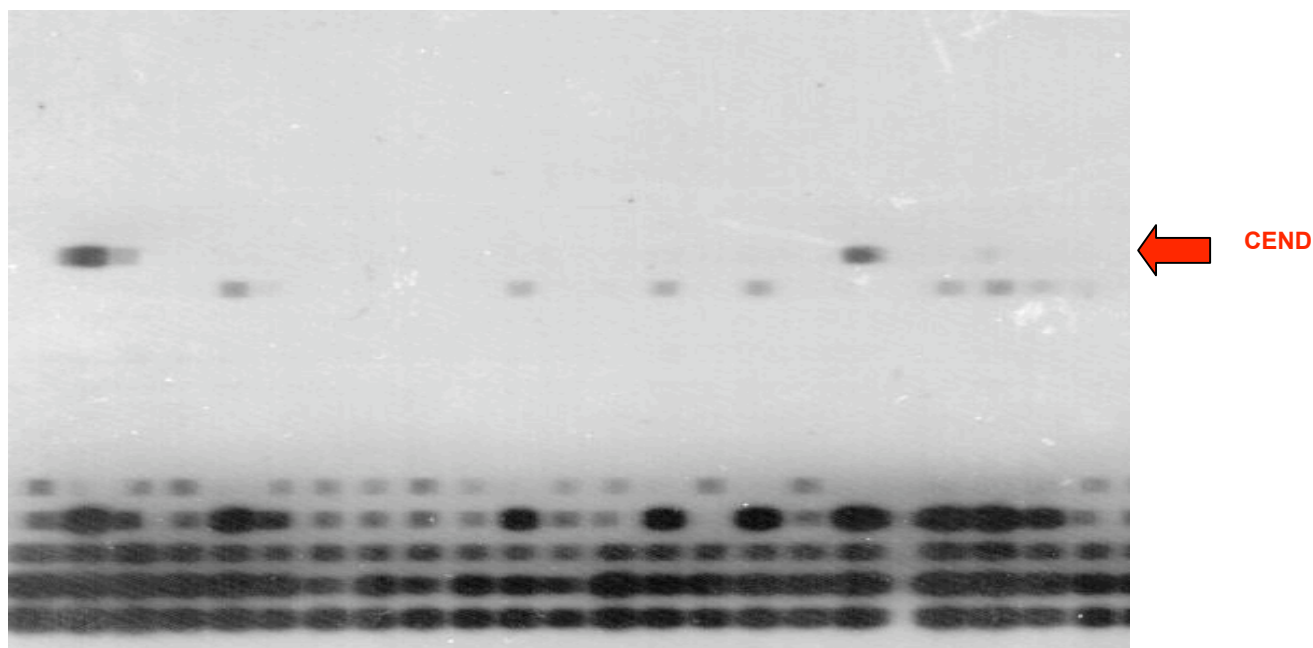


FIGURA 16 - Autoradiografia do *rifoligotyping* com identificação de mutação do *rpoB* no códon 531 e em códon específico não detectado (CEND).

Nota: códon específico não detectado (CEND)

Fonte: Dados do autor

TABELA 15 Mutações detectadas no gene *rpoB*

Códon	Alteração	Total de cepas	Cepas
531	TCG (Ser) → TGG (Trp)	2	9966, 14139
	TCG (Ser) → TTG (Leu)	6	8543, 14136, 14137, 14147, 14149, 14358
CEND	-	3	9984, 10927, 14134

Nota: códon específico não detectado (CEND); Serina (Ser); Triptofano (Trp); Leucina (Leu)

Fonte: Dados do autor

TABELA 16 - Avaliação comparativa entre teste de sensibilidade qualitativo e quantitativo para rifampicina e mutação do gene *rpoB*

		Teste qualitativo					
Mutação <i>rpoB</i>		S	R				Total
		Teste quantitativo (CIM)					
		S	MS	MR	R	Não realizado	
Presente	-	-	2	-	6	3	11
Ausente	-	-	1	-	2	...	3
Não realizado	7	...	1	...	2	...	10
Total	7	-	4	-	10	3	24

Nota: sensível (S); moderadamente sensível (MS); moderadamente resistente (MR); resistente (R); concentração inibitória mínima (CIM).

Fonte: Dados do autor.

5.3.2.3 Pirazinamida

Foram identificadas dez cepas resistentes à Z e em oito realizado sequenciamento do gene *pncA*. Constatou-se mutações do gene *pncA* em 62,5% (5/8) das cepas, sendo descritos quatro tipos de mutações, localizadas nos códons 136, 152, 175 e 99 (TAB. 17).

TABELA 17 Mutações detectadas nos isolados resistentes à pirazinamida

Códon	Alteração	Total de cepas	Cepas
152	Inserção T	2	8543, 14355
175	ATG (Met) → ATA (Ile)	1	14147
136	GAT (Asp) → AAT (Asn)	1	14146
99	TAC (Try) → TAG (stop)	1	14137

Nota: Metionina (Met); Isoleucina (Ile); Ácido aspártico (Asp); Asparagina (Asn); Valina (Val); Tirosina (Try); Mutação terminal (stop)

Fonte: Dados do autor

Em duas cepas foi identificada inserção de tirosina (T) na posição 152. Em uma cepa a mutação ocorreu na posição 175, com troca de guanina por adenina,

resultando na substituição da metionina (Met) por isoleucina (Ile). Outra cepa apresentou substituição da guanina por adenina na posição 136, havendo codificação de asparagina (Asn) em vez de ácido aspártico (Asp). A mutação na posição 99 resultou em stop códon, pela substituição da citosina pela guanina. Considerando-se o nível de resistência, observa-se que três cepas apresentaram CIM de 300 µg/mL e o restante CIM > 900 µg/mL (TAB. 18).

TABELA 18 - Avaliação comparativa entre teste de sensibilidade qualitativo e quantitativo para pirazinamida e mutação do gene *pncA*

		Teste qualitativo					
Mutação <i>pncA</i>		S	R				Total
		Teste quantitativo (CIM)					
		S	MS	MR	R	Não realizado	
Presente	-	-	2	-	3	...	5
Ausente	-	-	1	-	-	2	3
Não realizado	13	...	...	...	2	...	15
Total	13	-	-	-	-	2	23

Nota: sensível (S); moderadamente sensível (MS); moderadamente resistente (MR); resistente (R) ; concentração inibitória mínima (CIM).

Fonte: Dados do autor

A atividade de PZase foi estabelecida para nove das dez cepas resistentes a Z. Dessas, quatro (4/9) apresentaram resultado negativo, ou seja, inatividade enzimática, sendo que duas apresentaram mutação gênica do *pncA* e outras duas não tiveram estudo de mutação. Três cepas mutantes preservaram atividade enzimática (TAB. 19).

TABELA 19 - Correlação da mutação do gene *pncA* e atividade de pirazinamidase para cepas resistentes à pirazinamida

Atividade de pirazinamidase	Mutação do <i>pncA</i>			Total
	sim	não	não realizado	
Positiva	3	2	--	5
Negativa	2	--	2	4
Não realizado	--	1	--	1
Total	5	3	2	10

Fonte: Dados do autor

A TAB. 20 relaciona a atividade de Pzase com a CIM da Z. Todos os quatro isolados sem atividade de Pzase apresentaram CIM > 900 µg/mL.

TABELA 20 Relação entre atividade de pirazinamidase e teste de sensibilidade quantitativo da pirazinamida

Pirazinamidase	CIM		Total
	300 µg/mL	>900 µg/mL	
Positiva	3	1	4
Negativa	-	4	4
Total	3	5	8

Nota: concentração inibitória mínima (CIM); micrograma (µg); mililitro (mL)

Fonte: Dados do autor

5.3.2.4 *Etambutol*

Dez cepas apresentaram resistência ao etambutol. Em oito determinou-se a CIM, sendo que, para a maioria dos isolados (7/8), foi observada CIM ≥ 16 µg/mL. Sete cepas foram estudadas quanto à mutação no gene *embB* e, destas, 71,4% (5/7) apresentaram mutação do códon preferencial 306, conforme apresentado na TAB. 21.

TABELA 21 Mutações de *embB* detectadas nos isolados resistentes ao Etambutol

Códon	Alteração	Total de cepas	Cepas
306	AUG (Met) → AUA (Ile)	2	14136, 14137
	AUG (Met) → AUC (Leu)	1	14147
	AUG (Met) → AUU (Ile)	1	14355
	AUG (Met) → GUG (Val)	1	14139

Nota: Metionina (Met); Isoleucina (Ile); Leucina (Leu); Valina (Val)

Fonte: Dados do autor

Constatou-se em quatro cepas com mutação no códon 306, a substituição da guanina por adenina, citosina e uracila, codificando isoleucina, leucina e isoleucina em vez de metionina, respectivamente. Em uma cepa a mutação do códon 306 ocorreu pela substituição da adenina por guanina, resultando na troca do aminoácido metionina por valina. Em duas cepas resistentes não foi encontrada mutação para o gene *embB*. Em todas as cepas em que foi realizado sequenciamento foi demonstrada CIM elevada ($\geq 16 \mu\text{g/mL}$) (TAB.22).

TABELA 22 Avaliação comparativa entre TS, CIM e mutação *embB*

		Teste qualitativo					Total
Mutação <i>embB</i>		S	R				
		Teste quantitativo (CIM)					
		S	MS	MR	R	Não realizado	
Presente	-	-	-	-	4	1	5
Ausente	-	-	-	-	1	1	2
Não realizado	14	...	...	1	2	...	17
Total	14	-	-	1	7	2	24

Nota: sensível (S); moderadamente sensível (MS); moderadamente resistente (MR); resistente (R); concentração inibitória mínima (CIM).

Fonte: Dados do autor

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este estudo é inédito no Estado de Minas Gerais por empregar método molecular para a detecção de organismos resistentes através da identificação de mutações associadas, em correlação com informações demográficas e relativas à evolução da doença nos pacientes.

Ensaio realizado no contexto da realidade brasileira são escassos e alcançam áreas limitadas. A maioria das publicações nacionais contempla cepas dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul, além de, usualmente, apresentarem informações sobre resistência a uma única droga (BARCO *et al.* 2006; CARDOSO *et al.* 2004; CARDOSO *et al.* 2007; CARVALHO *et al.* 2003; DALLA COSTA *et al.* 2009; HÖFLING *et al.* 2005; MIRANDA *et al.* 2001; RODRIGUES *et al.* 2005; SENNA *et al.*, 2006; SPIES *et al.* 2008; VALIM *et al.*, 2000). O presente estudo contempla um panorama da resistência, para cinco drogas anti-TB, de cepas do Estado de Minas Gerais (CLEMENTE *et al.* 2008). A amostragem é representativa (cerca de 60%) dos casos notificados de TB resistente em MG para o período de 2000 a 2003, e os resultados possibilitam inferir sobre o tipo de cepa resistente que circula no Estado, além de determinar seu perfil fenotípico e genotípico.

Para instituir, na prática clínica, testes moleculares visando à detecção rápida de resistência, recomenda-se que, inicialmente, sejam realizados estudos regionais com objetivo de validar a capacidade discriminatória dessas técnicas em populações distintas, antes de seu amplo emprego. Neste sentido, este estudo contribui para delineamento deste perfil no Estado de Minas Gerais.

O II Consenso Brasileiro de Tuberculose (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004) aponta as linhas prioritárias de pesquisa recomendadas pelas diretrizes nacionais para controle da TB, com ênfase para estudos epidemiológicos referentes à mortalidade associada e inquérito de resistência, e, ainda, para o desenvolvimento

e validação de novas tecnologias de avaliação da resistência. Este trabalho vai ao encontro dessas determinações governamentais.

6.1 Caracterização dos pacientes

Dos 160 pacientes com diagnóstico presuntivo ou definitivo de TB pulmonar, 76 apresentaram suspeita clínica ou laboratorial de TB resistente e, destes, 24 confirmaram resistência através do TS. Dos pacientes submetidos ao TS, 31,6% (24/76) apresentaram resistência à pelo menos uma droga testada e 22,4% (17/76) eram portadores de cepas MDR pelo critério da OMS, considerando-se a resistência à H e à R.

A amostra de portadores de cepas resistentes contempla indivíduos com características diferentes daquelas habitualmente descritas para os pacientes com TB resistente, que se reconhece pertencerem a segmento marginalizado da sociedade, composto por usuários de drogas, sem teto, alcoólatras, HIV positivos, além de contactantes daqueles que albergam cepas resistentes (BLOCH *et al.*, 1994). Contudo, nessa casuística, o portador de TB resistente foi essencialmente aquele que interrompeu o tratamento. Tal fato é observado também nos países em que a TB é endêmica e nos quais se utiliza esquema terapêutico de boa eficácia. Neste sentido, esse fato desmistifica dogmas que qualificam os portadores de TB.

Aproximadamente 67% dos pacientes (16/24) eram do sexo masculino. Essa predominância pode refletir a maior prevalência da TB nos homens que nas mulheres, relacionada com a transmissão da doença (PEREZ-GUZMAN, VARGAS, TORRES-CRUZ, 1999). A idade média foi de 39,7 anos e essa predileção pode resultar tanto das características evolutivas da doença como também do tipo de unidade de internação nas quais esses pacientes foram atendidos, que recebe, preferencialmente, o público adulto.

Nos portadores de TB-MDR é frequente que as condições de habitação sejam precárias, incluindo indivíduos “sem teto” e aqueles moradores de habitações

coletivas (albergues, casas de apoio e pensões). Tais condições favoreceriam a disseminação e surtos da doença (EDLIN *et al.*, 1992). Entretanto, neste estudo, apenas um indivíduo era sem teto e a quase totalidade dos pacientes atendidos no HJK procedia de área urbana e com residência fixa.

Naqueles portadores de cepas resistentes, as comorbidades mais frequentes foram o tabagismo e o etilismo. A infecção pelo HIV, investigada em 83,3% dos casos, não foi confirmada em nenhum paciente. Provavelmente, esse fato se relaciona com o perfil de pacientes atendidos na instituição, considerando-se que o município de Belo Horizonte dispõe de serviço especializado no atendimento ao HIV positivo. Portanto, não se conseguiu com este estudo afastar ou estabelecer relação de coinfeção HIV com a resistência micobacteriana, pelas características da população atendida na instituição. Conforme dados da literatura internacional, é reconhecida a associação entre TB-MDR e a coinfeção pelo HIV. Entretanto, estudo regional, realizado no Brasil, não estabelece relação entre a resistência micobacteriana e a sorologia positiva para o HIV (LIBERATO *et al.*, 2004), apesar de registro oficial demonstrar frequência de associação de TB-MDR e infecção pelo HIV na ordem de 6,8%, superior à estimativa calculada de 0,5% da população geral (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Quanto à história de contato, metade dos pacientes (12/24) desconhece essa situação e aqueles que relataram contato se referiram ao domicílio, exposição ocupacional e hospitalar. Ressalta-se a importância da potencial transmissão durante a internação vigente, já que a identificação e o isolamento de portadores de TB resistente são usualmente tardios. Em geral, os pacientes não foram identificados como portadores de cepa resistente previamente ao primeiro atendimento na instituição e, na ocasião do estudo, o portador de cepa resistente não seguia protocolo específico de isolamento. Atualmente, o HJK possui unidade de internação específica para o acolhimento do portador de TB bacilífera.

Quanto à apresentação clínica, percebe-se que emagrecimento foi a única manifestação clínica com diferença estatística obtida pela comparação entre

pacientes portadores ou não de cepas resistentes. Tal diferença possivelmente se relaciona ao fato de que a TB pulmonar recente está associada à evolução aguda da doença, e a TB resistente, por sua vez, à evolução crônica, onde a perda ponderal já foi controlada.

Considerando-se os achados radiográficos, as cavitações e pulmões destruídos foram às alterações mais frequentes nos portadores de cepas resistentes. Os estudos de LESSNAU, GORLA, TALAVERA (1994) e, posteriormente, de BARROSO *et al.*, (2003a; 2003b) demonstram que portadores de cavitações pulmonares apresentaram maior associação com multirresistência e sugerem a adoção de medidas de controle mais rigorosas para esses casos. A presença de cavitação pulmonar pode se relacionar à evolução crônica da TB resistente, em contraste com os casos de TB de diagnóstico recente.

Cerca de 80% dos portadores de cepas resistentes apresentaram relato de doença prévia, e desses um terço apresentaram maior número de episódios prévios (três ou mais) e conseqüentemente, maior exposição às drogas. Sabe-se que a TB resistente resulta com frequência, do impacto do uso prévio da droga na seleção de cepas mutantes. Espera-se que, à medida que o número de tratamentos aumente, maior seja o abandono e o risco de estar infectado por cepa resistente. Esse achado coincide com a literatura, onde se afirma que, com o uso de drogas anti-TB eficazes, a emergência de resistência ocorreria em decorrência da irregularidade das tomadas e/ou de múltiplas interrupções (VERONESI, FOCACCIA, 2005). Entretanto, neste estudo, não foi possível determinar se os episódios prévios corresponderiam a recidiva ou re-infecção, uma vez que não se realizou acompanhamento horizontal e coleta seqüencial de amostras, essencial para avaliar o padrão do RFLP e determinar a presença ou não de similaridade gênica entre cepas de um mesmo paciente, no sentido de definir re-infecção ou reativação de doença latente. Para aqueles pacientes (4/24) que relataram o primeiro episódio de TB, acredita-se que a resistência seja primária, entendida como resistência em caso novo já que não houve contato prévio com as drogas.

Apenas um paciente não preencheu critério clínico-radiológico para o diagnóstico de TB. Considerando-se que esse indivíduo não recebeu tratamento durante permanência hospitalar, é possível que tenha ocorrido contaminação da amostra enviada para análise ou que apresente cultura positiva sem doença clínica. Relatos recentes confirmam, através de técnicas moleculares, que o diagnóstico de falsa TB é relativamente frequente e não estimado (BURMAN, REVES, 2000, CHANG *et al.*, 2001 e HEIFETS *et al.*, 2001). Optou-se pela manutenção desse paciente na amostragem, já que nenhuma cepa resistente processada na ocasião apresentou similaridade molecular pelo RFLP, o que torna improvável a contaminação cruzada com as cepas deste estudo.

Nos 17 pacientes portadores de cepas MDR, em nove (52,9%) ocorreu melhora com o esquema preconizado para TB-MDR pelo MS e Centro de Referência Hélio Fraga, cuja taxa de resposta prevista é da ordem de 61,4% (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Observou-se também que 17% dos pacientes portadores de cepas resistentes (4/24) abandonaram o tratamento, mesmo sendo acompanhados em centro de referência da doença. A elevada taxa de abandono possivelmente se relaciona com esquemas de longa duração, uso de medicações mais tóxicas e à administração parenteral. Nesse contexto, acredita-se que procedimentos que elevem os índices de adesão ao tratamento são imprescindíveis para garantir medidas de prevenção de disseminação de TB resistente.

6.2 Caracterização fenotípica das cepas: perfil de sensibilidade das cepas de *M. tuberculosis* às drogas anti-TB

Utilizou-se para o TS método radiométrico automatizado, considerado de escolha, através do Sistema BACTEC® 460, que apresenta índices de sensibilidade e especificidade elevados para todas as drogas testadas (BARRETO *et al.*, 2003). Contudo, nesse sistema, o tempo de detecção do crescimento bacilar (em torno de 15 dias) é menor que no método convencional, além de ser validado internacionalmente e aprovado pela OMS. Embora a detecção rápida de cepas resistentes seja, provavelmente, o fator isolado que melhor se relaciona com a

diminuição do contágio, nenhum método para detecção de resistência foi tido como ideal até o momento, pois, além da rapidez de resultados, deve se ter em conta à disponibilidade, simplicidade do método, formação e descarte de resíduos e biossegurança.

O TS radiométrico identificou, nas 24 cepas estudadas, 87,5% de resistência para H; 70,8% para R; 54,2% para S e 41,7% para o E. Quanto à Z, 43,5% das 23 cepas avaliadas foram resistentes a esse fármaco.

A maioria das cepas, cerca de 70% (17/24), foi classificada como MDR pelo critério da OMS. Das 17 cepas MDR, sete não apresentaram resistência adicional, mas dez apresentaram resistência combinada com outras drogas, sendo que em seis, notou-se resistência a todas as drogas testadas. Comenta-se que resistência à RHZ somada a E e S limita a eficácia dos esquemas 1, 1R e 3, ou seja, esquema básico, reforçado e de retratamento ou reserva. De acordo com o Guia de Vigilância Epidemiológica MS 2002 (BRASIL.MS/FUNASA Comitê Técnico Científico de Assessoramento a Tuberculose, 2002) é defensável que sejam oferecidos testes de sensibilidade aos pacientes com problemas terapêuticos. Nosso estudo reforça essa premissa, já que 41,7% das cepas avaliadas apresentaram resistência combinada e 25% resistência para as cinco drogas testadas, predizendo a não resposta clínica aos esquemas habitualmente propostos.

O II Consenso Brasileiro de TB (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004) recomenda que a cultura e TS com metodologia validada deve ser realizada para todos os casos de retratamento e suspeita de TB resistente (baseada em dados epidemiológicos locais e evolução definida pela persistência de baciloscopia positiva depois de iniciado tratamento, além de positividade após negatificação das baciloscopias nos controles mensais). Nesse estudo, selecionamos para o TS não somente pacientes com persistência de baciloscopia positiva como também aqueles que, por critérios clínico-epidemiológicos, foram identificados como de

maior risco para resistência, a exemplo de contactantes de TB-MDR e abandono do tratamento.

6.2.1 *TS quantitativo*

No Brasil existe dificuldade na realização do TS, tanto convencional quanto radiométrico, mesmo em instituições que admitem portadores de TB. Quando disponíveis, esbarra-se na discordância dos resultados. Assim, parece que, além da dificuldade para disponibilização desses testes para diagnóstico e tratamento, ocorre também a limitada uniformização dos resultados, necessitando-se de padronização e determinação das faixas de corte (estratificação). Os métodos radiométricos, apesar de onerosos e de demandarem treinamento específico, são rápidos e recomendados mundialmente, motivo pelo qual foram utilizados neste estudo.

As cepas resistentes no TS qualitativo apresentaram níveis distintos de sensibilidade às drogas no teste quantitativo. Considerando a estratificação da resistência através da determinação da CIM proposta por HEIFETS, em 1988, observa-se que a maioria das amostras apresenta níveis de resistência elevados.

Porém, o TS quantitativo para a S não apresentou capacidade discriminatória para quase metade das cepas, pois das 11 cepas resistentes a esta droga, cinco foram sensíveis na avaliação estratificada, conforme apresentado na TAB. 8. Nota-se que testes que avaliam resistência à S apresentam limitações, relacionada à fase de crescimento da micobactéria. A micobactéria na fase estacionária ou no início da fase *log* apresenta atividade metabólica lenta, fato que limita a entrada de S na célula, por menor transporte da droga através da parede celular do bacilo e menor ligação com a subunidade ribossomal 30S. Postula-se que a variabilidade dos resultados dos TS à S deve-se a sua realização ou não em fase de crescimento lento (MINGEOT-LECLERC, GLUPCZYNSKI, TULKENS, 1999).

6.2.2 *Correlação entre teste de sensibilidade das cepas e uso prévio da droga*

Dezessete pacientes (70,8%) utilizaram previamente esquemas de tratamento que incluíram R, H, e Z, sendo que foram identificadas 20 cepas resistentes à H, 17 resistentes à R e dez resistentes à Z. Treze pacientes utilizaram E e nove apresentaram resistência a esta droga. Onze pacientes utilizaram Et e S, sendo que treze apresentaram resistência à S.

A resistência secundária ou adquirida é usualmente mais frequente que a resistência primária, em países que utilizam esquemas de tratamento eficazes, a exemplo do Brasil, onde a maioria dos casos resistentes ocorre devido ao uso irregular de drogas ou abandono do tratamento. O Inquérito Nacional de Resistência apresenta índices de resistência adquirida de 0,8%, 6,7%, 0,2% e 3,9% para R, H, E e S respectivamente, além de 5,7% para R+H (BRAGA; BARRETO; HIJJAR., 2003). Contudo, neste trabalho os índices de resistência não permitem comparação com dados populacionais, uma vez que as cepas eram oriundas de amostra selecionada, pertencente a hospital de referência, com índices de resistência sabidamente mais elevados. No Inquérito Mundial do Programa de Tuberculose da OMS, o Brasil participou com amostragem representativa de 2.888 cepas de pacientes, tratados (n=793) e não tratados previamente (n=2.095), todos de origem ambulatorial e, portanto, diferentes da amostragem deste estudo. Destaca-se a diferença entre a taxa de multirresistência (R+H) de tratados (5,4%) e não tratados previamente (0,9%), demonstra a importância do uso prévio de medicamentos no desenvolvimento da resistência (BRASIL, Ministério da Saúde. FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002).

No Brasil, a notificação sistemática dos casos de multirresistência iniciou-se em 2000, e entre março de 2000 e dezembro de 2003 foram notificados 1469 casos de TB-MDR, sendo 66,4% na região sudeste e cerca de 42% (do total) no Estado do Rio de Janeiro. O II Consenso Brasileiro de Tuberculose (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004) informa 4% de resistência primária e 96% de resistência adquirida, com média de 2,8 tratamentos prévios e 41,8% de taxa de abandono (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

No presente estudo, não encontrou-se diferença, com significância estatística, entre perfil de sensibilidade e uso prévio das drogas. Considerando-se que essa relação foi estabelecida por diversos trabalhos científicos, pondera-se que a amostra possa ter sido pequena para comprovar tal fato. Estudo realizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro, em 2000, tratou desse tema e avaliou os fatores de predição para a resistência aos tuberculostáticos, estabelecendo aumento do risco para multirresistência em sete vezes naqueles pacientes expostos previamente às drogas anti-TB (NATAL *et al.*, 2003).

Cerca de 17% dos pacientes (4/24) apresentaram resistência primária, sendo dois portadores de cepa MDR. De acordo com o Inquérito Nacional de Resistência realizado pelo MS, em 1997, os índices de resistência primária à R e H foram respectivamente de 0,2% e 3,7% e de 0,8% para R+H (BRAGA *et al.*, 2003). A resistência primária reflete, em geral, falhas nas medidas de controle e prevenção da TB, favorecendo a disseminação das cepas resistentes. O presente estudo, ao apontar elevada taxa de abandono de tratamento (17%) no portador de cepa resistente, reforça a necessidade de implementar medidas de prevenção e controle, para redução da transmissibilidade, em especial em instituições de referência para o tratamento da TB.

6.2.3 Correlação entre teste de sensibilidade das cepas e evolução clínica dos pacientes

Quanto à evolução do tratamento vigente, observa-se que alguns pacientes informaram melhora clínica com esquemas 1, 1R e 3, a despeito de apresentarem resistência a pelo menos uma droga do esquema. Nesse sentido, reforça-se o conceito de efeito sinérgico com o uso de combinação de drogas (TAB. 10).

Nove pacientes melhoraram com esquema para tratamento de TB-MDR proposto pelo MS e um piorou. Dos pacientes que utilizaram esquema de tratamento para TB-MDR, 89,0% eram resistentes à R e à H e cerca de 50,0% apresentavam

sensibilidade à S e ao E, este último fármaco pertencente ao esquema referenciado pelo MS (TAB. 10).

Todos os pacientes que abandonaram o tratamento (4/24; 17%) eram MDR. Em que pese o uso de esquemas mais prolongados, com drogas onerosas, tóxicas e menos facilmente disponíveis, esse achado reforça a necessidade do aprimoramento de medidas de controle e prevenção da TB-MDR. Enfatiza-se a adoção de tratamento supervisionado, medida, esta, que tem se mostrado custo-efetiva, resultando na maior adesão e organização dos serviços, com menor taxa de abandono. O DOTS (*Direct Observed Therapy Strategy*), proposto pela OMS, prioriza o acompanhamento dos pacientes com maior risco de abandono, tais como usuários de drogas, alcóolatas, moradores de aglomerados, portadores de cepas resistentes, assim como daqueles em novo tratamento. A orientação de acompanhamento desses casos visa, individualmente, uma melhor qualidade da assistência médica e, coletivamente, o controle da disseminação de cepas resistentes.

DOLIN *et al.* (1994) relata que a morte atribuída à doença se relaciona com o tratamento tardio ou a sua falência. A morte de um dos dois pacientes que faleceram guarda relação com a doença.

De acordo com dados do II Consenso Brasileiro de Tuberculose (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004), que abrange cerca de quatro anos de registros de TB-MDR no Brasil com a notificação de 1469 casos, observou-se evolução para o óbito em 30,2%, sendo 8,4% por abandono do tratamento, 14,6% por falência terapêutica e 2,5% por recidiva verificada no primeiro ano após a alta. Ressalta-se que em nosso estudo a taxa de óbito foi menor e a de abandono de tratamento mais elevada. Entretanto, o tempo de acompanhamento dos pacientes foi pequeno para verificar a ocorrência de óbitos tardios. É possível que aqueles que abandonaram o tratamento ou nos quais o mesmo não foi eficaz, tenham evoluído desfavoravelmente.

6.3 Epidemiologia

A região sudeste é responsável por quase metade dos casos notificados de TB no Brasil. No período do estudo, o Estado de Minas Gerais notificou 5.501 casos de TB pulmonar (TAB. 1). Segundo a Secretaria Municipal de Saúde, neste mesmo período, foram notificados 703 bacilíferos, sendo 112 casos de TB pulmonar registrados pelo HJK.

Considerando-se os casos notificados de TB-MDR no Brasil, de 2000 a 2003, totalizando 1.214 casos, 45,4% deles ocorreram no Estado do Rio de Janeiro (BRITO *et al.*, 2004). No Estado de Minas Gerais, de acordo com banco de dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica de TB-MDR do Centro de Referência Hélio Fraga, foram registrados 31 casos de resistência. Tendo em vista os registros oficiais, observa-se que as amostras contempladas neste estudo perfazem cerca de 60,0% do total de casos de TB-MDR (informação pessoal de Margareth Dalcolmo, Serviço de Vigilância Sanitária, MS, julho 2005).

Comenta-se que informações referentes à TB resistente em MG são escassas, sendo também pequeno o número de estudos com cepas de *M. tuberculosis* no Estado. Acredita-se que a identificação da resistência seja dificultada pela deficiência de laboratórios especializados, incapazes de oferecer estrutura de referência e contra-referência para instituições de saúde que atendam a demanda do sintomático respiratório e de seus contatos.

Apesar da taxa oficial de TB resistente não ser elevada, mesmo levando-se em conta a subnotificação, acredita-se que para cada caso de TB confirmado existam, possivelmente, oito a dez infectados. Sendo assim, reforça-se a necessidade de se avaliar o risco iminente de transmissão. Além disso, é preciso salientar que a TB-MDR apresenta baixa taxa de cura e elevado custo de tratamento, cerca de 700 vezes maior daquele referente ao esquema 1, 1R e 3 (MAHMOUDI, ISEMAN, 1993)

6.3.1 Epidemiologia molecular: análise do fragmento IS6110

A análise do fragmento IS6110 por RFLP possibilita avaliar a similaridade filogenética (proximidade gênica entre as cepas), estabelecendo, em conjunto com informações epidemiológicas, se as cepas pertencem ou não ao mesmo *cluster*. Cada fragmento (banda) identificado no RFLP representa uma cópia da sequência de inserção IS6110, sendo que o número e tamanho dos fragmentos do DNA são utilizados para confirmar ou não a relação genética entre as cepas estudadas.

A tipificação molecular ou genotipagem tem sido aplicada na identificação e caracterização de cepas associadas à transmissão nosocomial (BIFANI *et al.*, 1996; FRENCH *et al.*, 1998; FRIEDEN *et al.*, 1995; MOSS *et al.*, 1997) bem como em investigação de surtos (BARNES *et al.*, 1997; DAHLE *et al.*, 2003; KUBIN *et al.*, 1999; JEREB *et al.*, 1995). O uso combinado de técnicas de epidemiologia convencional e molecular possibilita o aumento da acurácia sendo, atualmente, considerado instrumento necessário para se estabelecer relação epidemiológica na TB, determinando, inclusive, o caso índice na vigência de surtos.

Esses testes também são aplicados para a confirmação da ocorrência de contaminação cruzada no laboratório (CARRICAJÓ *et al.*, 1999; FILHO *et al.*, 2002; SMALL, MOSS, 1993). Estudos mostram que 0,9% a 3,5% dos pacientes nos quais o *M. tuberculosis* foi isolado não têm TB, estando as culturas positivas em consequência da contaminação cruzada. Esse evento é mais propenso a ocorrer quando a baciloscopia é negativa e a cultura positiva, ou se a micobactéria é isolada naquele paciente sem quadro clínico de doença. Para esses casos, a genotipagem do isolado pesquisado e dos isolados processados ao mesmo tempo no laboratório pode esclarecer a ocorrência de contaminação cruzada, evitando o tratamento desnecessário (BARNES, CAVE, 2003; JASMER *et al.*, 2002; KANDUMA *et al.*, 2003; McNABB *et al.*, 2002).

Estudos populacionais de larga escala, que utilizam técnicas de genotipagem aplicada à epidemiologia, têm sido realizados com o objetivo de investigar a transmissão e disseminação de cepas em diferentes áreas geográficas (BIFANI *et*

al., 2002; FRIEDMAN, STOECKLE, KREISWIRTH, 1997; LIN *et al.*, 1996; TORREA *et al.*, 1995). Essa tecnologia também é útil na avaliação de programas de controle da TB, (ELLIS *et al.*, 2002; KONG *et al.*, 2002; McNABB *et al.*, 2002; MUNSIFF *et al.*, 2002) bem como para determinar os fatores de risco associados à TB (BLACKWOOD *et al.*, 2003; FANDINHO *et al.*, 2000; FERDINAND *et al.*, 2003; VUKOVIC *et al.*, 2003).

Neste estudo, não foi encontrada semelhança no perfil das bandas geradas pela digestão com enzimas de restrição e analisados pelo *fingerprinting*. Portanto, não foi observado padrão de RFLP similar, restringindo-se a chance de clonalidade das amostras resistentes. A genotipagem, somada às informações epidemiológicas, demonstra a diversidade da amostra avaliada, confirmando a hipótese de que as cepas do estudo não apresentaram relação epidemiológica evidente. Assim sendo, limita-se a possibilidade de transmissão nosocomial atual e contaminação laboratorial entre as amostras pesquisadas. Em virtude da pequena amostragem não randomizada, não é possível extrapolar nossos achados para além do comentado.

6.4 Resistência às drogas e mutações associadas

6.4.1 Isoniazida

O mecanismo de ação da H é complexo e pelo menos cinco diferentes genes (*katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA* e *ndh*), apresentam mutações relacionadas à resistência a esse fármaco. Neste estudo, foram identificadas 21 cepas resistentes à H no TS qualitativo, as quais foram avaliadas quanto ao nível de resistência e à presença de mutações nos genes *katG*, *ahpC* e *inhA*, através de sequenciamento gênico.

Estudos moleculares demonstram que mutações do gene *katG* são as alterações gênicas mais frequentemente associadas à resistência à H. Apesar de outras mutações terem sido localizadas em outras regiões do genoma, elas ocorrem em frequência bem inferior às observadas para o *katG* (CARDOSO *et al.*, 2004). Até o

momento, inúmeros trabalhos, realizados em todo o mundo, demonstraram frequência de mutação do *katG* variando de 36,0 a 100,0% (aproximadamente 70,0%) nas cepas H resistentes, sendo interessante a destacada preferência por mutação localizada na posição 315 (ABAL; AHMAD; MOKADDAS, 2002; ABATE *et al.*, 2001; ESCALANTE *et al.*, 1998; HAAS *et al.*, 1997; MARTTILA, SOINI, HUOVINEN, 1996; MARTTILA *et al.*, 1998; MOKROUSOV *et al.*, 2002; RAMASWAMY *et al.*, 2003; TORRES *et al.*, 2002; van RIE *et al.*, 2001; van SOOLINGEN *et al.*, 2000). Em nosso estudo, a mutação do gene *katG* foi identificada em 75,0% (15/20) das cepas resistentes nas quais foi realizado sequenciamento, sendo que a maioria das mutações (93,3% ou seja 14/15) ocorreu no códon 315. As mutações pontuais foram as mais frequentes. A mutação de substituição da serina por treonina na posição 315 (S315T) foi observada em todas as cepas mutantes do códon 315. Esse achado coincide com descrições de estudos anteriores (ABAL, AHMAD, MOKADDAS, 2002; FANG *et al.*, 1999; HAAS *et al.*, 1997; MARTTILA *et al.*, 1998). Sabe-se que variações geográficas são relatadas e apesar da mutação do códon 315 ser habitualmente a mais comum, sua frequência é variável.

MUSSER *et al.*, em 1996, avaliaram 85 cepas H resistentes de diversas origens e identificaram mutação do códon 315 em 58,0% dos isolados. HAAS *et al.*, (1997) observaram que 68,0% das cepas resistentes à H apresentaram mutação de substituição no códon 315, usualmente S315T. DOBNER *et al.*, (1997) demonstraram que 26 de 27 isolados H resistentes da Alemanha e Serra Leoa apresentavam mutações do códon 315. MARTTILA *et al.*, (1998) demonstraram que 22/24 isolados resistentes a H de São Petersburgo (Rússia) apresentaram substituição S315T. Resultados similares foram observados por ESCALANTE, *et al.*, (1998), trabalhando com amostras originadas do Peru, em que 79,0% dos isolados apresentaram mutação S315T.

No Brasil, estudos recentes apresentam variações na frequência da mutação S315T dentre os isolados H resistentes dos Estados de São Paulo (60,0%), Rio Grande do Sul (60,9%) e Rio de Janeiro (87,1%) (SILVA *et al.*, 2003). Evidências

sugerem que regiões de alta endemicidade de TB estão associadas a elevados índices de mutação *S315T* do gene *katG* (SILVA *et al.*, 2003). Nosso estudo observou que a totalidade das cepas com mutação do *katG* na posição 315 apresentou substituição *S315T*.

Em relação ao códon 315 do *katG*, a substituição mais comum descrita é a AGC (Ser) por ACC (Thr) ou seja, *S315T*. Contudo, outras mutações, a exemplo de ACA (Thr), ATC (Ile), AGA (Arg), CGC (Arg), AAC (Asp) e GGC (Gly), já foram identificadas (SILVA *et al.*, 2003).

Mutações do gene *katG* localizadas em outros códons, a exemplo do que ocorre na posição 463, polimorfismo caracterizado pela substituição CGC (Arg) por CTG (Leu), posição 138 (Asn → Ser ou His) e posição 328 (Trp → Gly ou Leu ou Cys), também são frequentes (COCKERILL *et al.*, 1995; DOBNER *et al.*, 1997; HAAS *et al.*, 1997; HEYM *et al.*, 1995; MUSSER *et al.*, 1996; PRETORIUS *et al.*, 1995; ROUSE *et al.*, 1995; ROUSE *et al.*, 1996). Em nosso estudo, foi encontrada mutação no códon 299 em uma cepa, com a substituição da Ser por Gly já anteriormente citada, no trabalho de CARDOSO, *et al.*; em 2004.

Considerando-se a correlação entre presença de mutação em *katG* e nível de resistência (CIM), observa-se que das 18 cepas H resistentes com avaliação de mutação e determinação da CIM, 13 mostraram mutação no *katG* (72,2%), sendo que 12 apresentaram CIM superior a 4 µg/mL. Vários estudos apresentam associação entre mutação do *katG* e resistência de alto grau, ou seja, níveis de CIM elevados para H (ABATE *et al.*, 2001; CARDOSO *et al.*, 2004; RAMASWAMY, MUSSER 2003; SILVA *et al.*, 2003; van DOORN *et al.*, 2001, 2003; van SOOLINGEN *et al.*, 2000). Contudo, os autores utilizaram valores distintos para resistência de alto grau, fato que limita o estabelecimento de comparações. Ressalta-se também que, alguns estudos estabelecem valores muito elevados de CIM para resistência de alto grau. Nesse sentido, têm-se informações de menor aplicabilidade clínica, uma vez que a elevação da concentração sérica da droga, na prática não é possível de ser atingida devido à toxicidade do fármaco. Neste

estudo, tendo em vista a escassez da literatura em estabelecer níveis específicos para resistência de alto grau, adotou o sistema de estratificação proposto por HEIFETS (1988). Esse sistema apresenta intervalos de CIM que correlaciona com classificação das cepas em: sensíveis, moderadamente sensíveis, moderadamente resistentes e resistentes.

Do ponto de vista clínico ressalta-se que o tratamento da TB depende não somente da característica fenotípica da cepa resistente, mas também da biodisponibilidade da droga e da interação entre os fármacos. O estudo de ABATE *et al.* (2001) relata que os níveis alcançáveis de H no sangue dependem da dose administrada e que, após dose de 15 mg/kg, considerada elevada, tem-se 11 µg/mL de nível sérico. Esse mesmo estudo afirma que níveis séricos elevados são difíceis de serem alcançados clinicamente, sendo valores de CIM iguais ou superiores a 16 µg/mL potencialmente inatingíveis pelo esquema proposto pelo Ministério de Saúde, com administração diária de medicação. Acresça-se que a atividade da H pode ser potencializada pelo uso de outras drogas, a exemplo do E e S, ou mesmo pelo uso combinado da melatonina. Assim, a H pode ainda ser benéfica no tratamento de alguns portadores de TB-MDR, como aqueles com níveis de CIM baixos, usualmente próximos de 2 µg/mL.

Alguns estudos, como o de MARTTILA *et al.*, (1998), PRETORIUS *et al.*, (1995), e ROUSE *et al.*, (1996) não identificaram substituições do *katG* na posição 315. Nesses estudos, as amostras apresentavam níveis de resistência à H de baixo grau. Em nosso estudo, por outro lado, quatro das cinco cepas sem mutação em *katG* apresentaram CIM >4 µg/mL.

Apesar de mutações do gene *katG* serem responsáveis pela maioria dos casos de resistência à H, aproximadamente 30,0% das cepas mutadas apresentam o envolvimento de outros genes.

Os genes *katG* e *ahpC* codificam respectivamente as enzimas catalase-peroxidase e alquil-hidroredutase, sendo que a expressão deles é regulada por uma proteína

regulatória da transcrição, denominada *OxyR* (FARR, KOGOMA, 1991). Esses genes (*katG* e a região promotora *oxyR-ahpC*) apresentam relação estreita, visto que mutantes *katG* apresentam aumento da expressão da proteína codificada pelo *ahpC*. Nesse caso, as cepas mutantes *katG* (resistentes à H), para sobreviver, compensam a perda da atividade de catalase-peroxidase por meio de outra mutação, agora no *ahpC* (SHERMAN *et al.*, 1996). Sabe-se que mutações do *oxyR* e *ahpC* determinam alterações na sensibilidade da cepa a H (DERETIC *et al.*, 1995, SHERMAN *et al.*, 1995 e 1996).

WILSON, COLLINS (1996) avaliaram a sequência de DNA de cepas de *M. tuberculosis* nas regiões dos genes *oxyR*, *ahpC* e região intergênica, e demonstraram alguns polimorfismos localizados na região intergênica *oxyR-ahpC* associados a alterações do *katG* e à redução da atividade catalase-peroxidase. Vários outros autores observaram aumento da expressão do gene *ahpC* em isolados resistentes à H e sem mutação no gene *katG* (DERETIC *et al.*, 1995; SHERMAN *et al.*, 1995). Entretanto, o *ahpC* parece não estar envolvido isoladamente na resistência à H, *per se*, sugerindo correlação seletiva com mutantes *katG* negativos.

Assim, considerando que mutações na região promotora do *ahpC* em cepas resistentes à H, *katG* negativas, podem favorecer a hiperexpressão do *ahpC* (mecanismo compensatório para perda da função de *katG*), a avaliação conjunta do *katG* e *ahpC* parece ser eficiente marcador de resistência à H (TELENTI *et al.*, 1997b; ZHANG, TELENTI, 2000).

Em nosso estudo, das 20 cepas resistentes à H seqüenciadas, quatro apresentaram mutação no gene *ahpC*, sendo que uma apresentou também mutação no *katG*. As mutações do *ahpC* descritas foram C(-39)T, C(-30)T, C(-12)T e G(-9)A. Como se observa, a maioria das mutações do gene *ahpC* ocorreu em região *up-stream*, ou seja, acima da região codificadora do gene. A análise do nível de resistência revelou que a maioria das cepas resistentes mutantes de *ahpC*

apresentou CIM maior que 4 µg/mL, em concordância com os estudos de KELLEY *et al.* (1997) e KIEPIELA *et al.* (2000).

No presente estudo, 15 das 20 cepas resistentes à H apresentaram mutação do *katG*, enquanto três das cinco sem mutação em *katG* foram mutantes de *ahpC*. Portanto, o emprego dos testes genotípicos *katG* e *ahpC* permitiu detectar 18 das 20 (90,0%) cepas resistentes à H. Observa-se também que o emprego dos testes genotípicos referentes a *katG* e *ahpC* detectou 15 das 16 (93,7%) cepas resistentes com CIM superior a 4 µg/mL.

Outro gene associado a resistência à H é o *inhA*, que codifica a proteína enoil-redutase, essencial para a síntese normal dos ácidos micólicos, a qual é inibida pelo fármaco. (BANERJEE *et al.*, 1994). Mutações nesse gene podem determinar resistência tanto à H quanto à Et, principalmente naquelas cepas resistentes em que não foi identificada mutação no *katG* e *ahpC*. Apesar de pesquisada em todas as cepas H resistentes, não foi observada mutação de *inhA* na amostragem. Provavelmente, nessas cepas, o mecanismo de resistência não é genético ou está localizado em porção não pesquisada do genoma.

Embora esses achados mostrem que a pesquisa de *inhA* não contribuiu para a detecção genotípica da resistência à H, SILVA *et al.* (2003), estudando cepas do Brasil, descreveram 10,1% de mutação na região regulatória desse gene e 2,9% na região codificadora, em 69 amostras resistentes provenientes dos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul. Nesse contexto, estudos mais abrangentes, representando as diversas regiões do Brasil, devem ser implementados para estabelecer a importância da detecção da mutação do gene *inhA* na identificação de cepas resistentes à H no país.

Vários estudos realizados em regiões diversas do mundo identificaram mutações tanto na região promotora quanto no gene estrutural do *inhA* (BASSO *et al.*, 1998; KIEPIELA *et al.*, 2000; RAMASWAMY, MUSSER *et al.*, 1998), porém os trabalhos diferem drasticamente quanto à frequência de mutações do *inhA* para cepas

resistentes (DOBNER *et al.*, 1997; MDLULI *et al.*, 1996; O'BRIEN *et al.*, 1996; TELENTI *et al.*, 1997b).

6.4.2 Rifampicina

O mecanismo de atividade da R depende de sua ligação com a subunidade β da RNA polimerase, o que resulta na inibição da transcrição. Dessa maneira, o processo de síntese protéica fica comprometido e a célula é destruída pela não renovação de constituintes vitais (McCLURE, CECH, 1978).

O gene *rpoB* codifica a RNA polimerase e mutações no *locus* do gene determinam resistência à droga em aproximadamente 96,0% das cepas R resistentes. Vários estudos demonstram que isolados R resistentes, não epidemiologicamente relacionados, apresentam mutações (inserções ou deleções) localizadas preferencialmente na região de core de 81 pb do gene *rpoB*, que corresponde aos códons 507 a 533. Essa região ou sequência, codificadora de 27 aminoácidos, foi denominada região determinante de resistência (RDR) à R (DONNABELLA *et al.*, 1994; HEYM *et al.*, 1994; KAPUR *et al.*, 1994; KAPUR *et al.*, 1995; MORRIS *et al.*, 1995; TELENTI *et al.*, 1993).

Nesse contexto, um importante estudo desenvolvido por MUSSER (1995) descreve as principais mutações da RDR, sendo que 43,0% das cepas R resistentes apresentaram mutações no códon 531 (Ser) e 36,0% no códon 526 (His). As substituições mais frequentes foram a S531L (42,0%) e H526Y (26,0%) (MUSSER, 1995). Posteriormente, outros autores confirmaram esses achados e estenderam a compreensão desses princípios com a observação da frequência de distribuição dessas mutações, em diferentes áreas geográficas (CAUGANT *et al.*, 1995; ESCALANTE *et al.*, 1998; RINDER *et al.*, 1997). Mais recentemente, MATSIOTABERNARD, VRIONI, MARINIS (1998), POZZI *et al.* (1999), GARCIA *et al.* (2001), MANI *et al.* (2001) e YUE *et al.* (2003), confirmaram o postulado, com a utilização de métodos distintos. Nesses estudos, a frequência de mutação do *rpoB* variou de entre 70,0 e 97,0%.

Estudos similares, como o de VALIM *et al.* (2000) e MIRANDA *et al.* (2001), foram conduzidos com cepas do Brasil. VALIM *et al.* (2000) analisaram 100 isolados de *M. tuberculosis*, sendo 82 resistentes à rifampicina dos Estados do Rio Grande do Sul (n= 38), São Paulo (n= 19) e Rio de Janeiro (n= 25). A maioria das mutações associadas à resistência ocorreu em apenas um nucleotídeo (81%), e envolvendo sete códons. Onze isolados (13,4%) apresentaram mutações mais complexas. Os códons mais frequentemente afetados por mutações pontuais foram o 531 (54,0%), o 526 (21,0%) e o 516 (7,0%). Nenhuma mutação foi observada nas 18 cepas sensíveis estudadas. Naquele estudo, os isolados do Rio Grande do Sul e São Paulo apresentaram semelhança quanto à frequência das mutações. As amostras do Rio de Janeiro demonstraram maior variação de mutações, algumas das quais não foram observadas nas outras cepas do estudo ou em relatos de literatura. A maioria das mutações identificadas foram aquelas comumente encontradas em outras partes do mundo. MIRANDA *et al.*, (2001) estudaram mutações do gene *rpoB* em 62 cepas de *M. tuberculosis* resistentes e sensíveis, isoladas do Brasil e França. Foram identificadas mutações em 100,0% das cepas resistentes à R oriundas da França e 89,0% das cepas do Brasil. Nenhuma mutação foi detectada nas 28 cepas sensíveis à R. As cepas resistentes da França apresentaram mutações nos códons 531 (31,2%), 526, 513 e 533 (18,7% cada). As cepas resistentes do Brasil apresentaram mutações nos códons 531 (72,2%), 526 (11,1%) e 513 (5,5%). Questionou-se a heterogeneidade das cepas da França, provavelmente relacionadas ao fato de que essas cepas foram isoladas de pacientes dos continentes africano e asiático. Todavia, para nenhum desses estudos foi estabelecida a correlação entre as mutações gênicas encontradas e o grau de resistência das cepas.

Em nosso estudo, foram identificadas 17 cepas resistentes à R sendo que em 14 foi realizada pesquisa de mutação por ribotipagem. Observou-se que 11 cepas apresentaram mutação do gene *rpoB*, sendo a mais frequente localizada no códon 531(72,7%; 8/11). Em três cepas não foi observada mutação de *rpoB* no códon 531, mas foi detectada mutação em códon não especificado (CEND). Assim sendo,

78,6% das cepas (11/14) apresentaram mutação no *locus* determinante de resistência.

Estudos foram conduzidos no sentido de correlacionar mutações específicas do *rpoB* e CIM da cepa resistente, evento primeiramente sugerido por BODMER *et al.* (1995). Apesar de algumas diferenças entre os estudos, considera-se que mutações nos códons 513, 526 ou 531 estão associadas a elevado grau de resistência, e que mutações nas posições 514 ou 533 resultam em resistência de baixo grau (OHNO *et al.*, 1996; MOGHAZEH *et al.*, 1996; TANIGUCHI *et al.*, 1996), embora o valor de corte da CIM varie entre os estudos. Outros trabalhos (CHAVES *et al.*, 2000; OHNO *et al.*, 1997) também sugerem que não só o local como o tipo de mutação determinaria o nível de resistência. Em ambos os casos, observaram que a substituição de Leu (leucina) pelo Trp (triptofano) no códon 531 resultou em CIM mais elevada do que a observada com as substituições de aminoácidos nos códons 526 e 516, resultando em escala de grau variável de resistência à droga. Em nosso trabalho, 71,4% (10/14) das cepas resistentes à R apresentaram CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$, sendo que em 60,0% (6/10) dessas foi identificada mutação do *rpoB*. Do total de cepas mutantes para o gene pesquisado, 75,0% apresentaram CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$.

O estudo de CHAVES *et al.*, realizado em 2000, foi conduzido com 29 cepas de *M. tuberculosis* resistentes à R, sendo 15 obtidas de população carcerária de Madri e 14 da população geral da Espanha. Caracterizou-se esses isolados através da análise da sequência de DNA da região de 81 pb que codifica o gene *rpoB* e *fingerprinting* do fragmento IS6110. Todos os isolados apresentaram mutações no *rpoB*, 41,0% no códon 531. Dos 29 isolados, 23 (79,0%) apresentaram alta resistência à R, com CIM ≥ 64 mg/L, determinado por método convencional. O estudo do *fingerprinting* identificou 19 cepas distintas. O restante dos isolados apresentava similaridade no padrão do fragmento IS6110, fato que demonstra elo epidemiológico. Essa publicação sugere o uso do *rpoB* na determinação da resistência e na discriminação de cepas resistentes à R com idêntico padrão de IS6110.

Acrescenta-se que, como a resistência à R está em 90,0% dos casos associada à resistência à H, poderia se utilizar a identificação da mutação *rpoB* como marcador de TB-MDR (DROBNIEWSKI *et al.*, 1998; RATTAN, KALIA, AHMAD, 1998; TELENTI *et al.*, 1993). Nesse caso, a identificação de mutação no *rpoB* é utilizada para *screening* de resistência. Vários estudos recentes, como os de VIEDMA (2003), HAZBON (2004), WADA *et al.* (2004), AKTAS *et al.* (2005) e ZHAO *et al.* (2005) reconhecem e utilizam essa tecnologia na detecção da multirresistência, sugerindo implementação mais ampla desses testes.

Mais recentemente, HOFLING *et al.* (2005), em estudo realizado pela Universidade Estadual de Campinas, avaliaram 468 cepas resistentes à H no Brasil e determinaram a frequência das mutações de *katG* e *rpoB*. Observaram que todas as cepas resistentes à R apresentaram mutação do *rpoB*. Esse trabalho reforça a elevada correlação da resistência entre duas drogas (RH) e sugere utilizar-se a mutação de *rpoB* como marcador para o diagnóstico da TB-MDR, uma vez que a determinação de mutação no *rpoB* apresenta elevada sensibilidade para as cepas de *M. tuberculosis* resistentes do Brasil.

Em nosso estudo, das 17 cepas de *M. tuberculosis* consideradas MDR, 14 foram submetidas a estudo de mutação no gene *rpoB*, sendo detectadas mutações em 11 cepas. Caso o *rpoB* fosse utilizado como teste de *screening* para TB-MDR, seriam detectadas 78,6% das cepas MDR geneticamente estudadas. A detecção isolada de mutação de *katG* identificaria 82,4% (14/17) das cepas MDR. Contudo, a detecção combinada de *rpoB* e *katG* reconheceria 88,2% (15/17) dessas.

6.4.3 Pirazinamida

Mutações do gene *pncA*, que codifica a PZase, enzima conversora da Z em fármaco ativo, têm sido demonstradas em cepas de *M. tuberculosis* resistentes à Z. MORLOCK *et al.* (2000) e SOINI, MUSSER (2001) estudando cepas de diversas localidades geográficas, identificaram mutações no gene *pncA* em 72,0% a 100,0%

das cepas resistentes à Z, ausentes nas cepas sensíveis. Esses achados foram também relatados em outros estudos (HIRANO *et al.*, 1999; SCORPIO *et al.*, 1997; SREEVATSAN *et al.*, 1997a). Todavia, observa-se que, para a maioria dos trabalhos, mutações do *pncA* apresentam ampla diversidade de localização nesse gene.

Historicamente, SCORPIO, ZHANG, em 1996, clonaram e caracterizaram o gene *pncA*, que codifica uma proteína de 186 aminoácidos, observando que mutações nos códons 63, 138, 141 e 162 resultavam em polipeptídeo inativo. Nesse caso, essas cepas mutantes não apresentavam atividade de PZase e exibiam CIM >500µg/mL. Posteriormente, SREEVATSAN *et al.* (1997a) estudaram 67 cepas Z resistentes e 51 cepas Z sensíveis de *M. tuberculosis*, recuperadas de diversas regiões geográficas e sítios anatômicos, e analisaram o IS6110. Todos os isolados susceptíveis à Z apresentavam idêntico perfil de *pncA*; 72,0% dos 67 isolados resistentes apresentaram mutações do *pncA* que determinaram alterações na sequência de aminoácidos da PZase. No mesmo ano, SCORPIO *et al.* (1997), estudaram cepas resistente à Z, através de sequenciamento gênico, e encontraram resultados similares aos de SREEVATSAN (1997a), contudo, observaram que cepas mutantes que perderam a atividade de PZase apresentaram níveis de resistência elevados (CIM >900µg/mL). HIRANO *et al.* (1999) compararam cepas sensíveis e resistentes à Z de nove diferentes países, relatando que cepas sensíveis não apresentavam alterações no gene. MESTDAGH *et al.*, (1999) testaram 62 cepas de *M. tuberculosis* MDR quanto à atividade da PZase e susceptibilidade à Z. O sequenciamento do gene *pncA* das 23 cepas resistentes à Z revelou mutações em 17 cepas com atividade de PZase negativa. Foram observadas mutações em 17 das 23 (aproximadamente 74%) cepas definidas como Z resistentes pelo método radiométrico. Onze cepas apresentaram mutações que não haviam sido descritas anteriormente, sendo essas mutações distribuídas ao longo do gene.

No Brasil, RODRIGUES *et al.* (2005), estudando cepas resistentes de isolados clínicos, observaram que 61,1% das cepas apresentaram mutações de substituição

em uma determinada região que contempla os códons 128 a 171. Esses achados concordam com os estudos de SCORPIO *et al.* (1997) e LEMAITRE *et al.* (1999), os quais advogam que poderiam ser essas as regiões no gene *pncA* determinantes da estrutura ou função catalítica da PZase.

Em nosso estudo, observou-se que cerca de 60% das cepas resistentes à Z avaliadas pelo sequenciamento apresentaram mutações do gene *pncA*. Embora o gene *pncA* seja pequeno, foram identificadas várias mutações em posições diversas de sua estrutura e essa heterogeneidade na localização das mutações (distribuídas entre a posição 99 a 175 do gene) confirma relatos anteriores, apesar da pequena amostragem avaliada. Não foram identificadas alterações gênicas na região regulatória do gene, a despeito das descrições de SCORPIO *et al.* (1997), MARTTILA *et al.* (1999), PARK *et al.* (2001), SUZUKI *et al.* (2002) e PORTUGAL *et al.* (2004).

Ressalta-se que a instabilidade gênica é tida como característica peculiar do *pncA* (ZHANG, MITCHISON, 2003), não sendo frequente para outros genes associados à resistência a drogas anti-TB. Baseado na elevada diversidade de localização da mutação no gene *pncA*, alguns autores sugerem a sua utilização para caracterização de cepas em investigação de surtos, através de técnicas moleculares (MORLOCK *et al.*, 2000).

Considerando-se a CIM, vários estudos relacionam mutação com níveis de resistência da Z e atividade de PZase. MORLOCK *et al.*, (2000) avaliaram correlação entre mutações do gene *pncA* e resistência à Z de 60 cepas de *M. tuberculosis* e observaram que a mutação no gene *pncA* correlaciona com CIM usualmente ≥ 100 $\mu\text{g/mL}$, com perda da atividade PZase (34 de 37 cepas). Foram identificadas 30 diferentes mutações nas 37 cepas resistentes à Z, o que reforça o elevado grau de diversidade genética do gene *pncA* nos isolados de *M. tuberculosis* Z resistentes.

A maioria das cepas resistentes à Z (62,5%) apresentou CIM elevada (>900 µg/mL). Em relação à PZase, observou-se a manutenção da atividade enzimática para várias cepas resistentes à Z com e sem mutação do *pncA*, o que sugere que outros genes e/ou outros mecanismos, como bomba de efluxo ou alterações metabólicas, possam estar envolvidos no desenvolvimento da resistência a droga, como apontado por ZHANG, MITCHISON (2003). Apesar da PZase não ter sido eficiente marcador de resistência, para essa casuística, observou-se boa correlação da inatividade enzimática com CIM >900 µg/mL. Como poucas cepas foram testadas, é necessário que estudos com maior amostragem sejam realizados em cepas do Estado de Minas Gerais. Outra limitação para o uso da PZase como marcador de resistência à Z é a necessidade de grande volume bacilar para realização do teste, o que demanda tempo e cultivo prévio (mínimo de três semanas).

6.4.4 Etambutol

O E é uma droga micobactericida, que atua na inibição da incorporação do ácido micólico na parede da célula (TAKAYAMA *et al.*, 1979). Em 1989, TAKAYAMA *et al.*, demonstraram que o E inibiu a transferência de arabinogalactano para a parede celular, fato esse que resultou no acúmulo de ácido micólico. Posteriormente, foi sugerido que o alvo do E na micobactéria seria a arabinosil transferase (WOLUCKA *et al.*, 1994), enzima responsável pela biossíntese da parede celular. O E seria um análogo da arabinose que bloquearia essa enzima (RODRIGUES, 2005).

Estudos moleculares identificaram, em várias espécies de micobactérias, *locus* gênicos que codificam a arabinosil transferase, organizados no operon *embCAB* (BELANGER *et al.*, 1996, TELENTI *et al.*, 1997b; SREEVATSAN *et al.*, 1997b). Análises posteriores demonstraram que cepas E resistentes apresentavam mutações do operon *embB* em aproximadamente 70% dos isolados (RAMASWAMY, MUSSER, 1998).

BELANGER *et al.* (1996) estudaram 72 cepas de *M. tuberculosis*, sendo 28 E resistente, e avaliaram as mutações do operon através do sequenciamento automático do DNA e da análise do SSCP. Dentre os isolados E resistentes, não epidemiologicamente relacionados, foram identificadas mutações no códon 306 em 13 das 28 cepas resistentes (46,4%). As substituições de aminoácidos ocorreram na metionina, substituída pela isoleucina ou valina. Nas 44 cepas sensíveis não foi identificada nenhuma mutação. Nesse mesmo estudo, realizou-se também a análise da estrutura secundária do *embCAB* e identificou-se que o gene codifica uma proteína integral de membrana, com 12 domínios transmembrana. Foi postulado, também, que a resistência ao E estaria localizada em uma região RDR, situada no *loop* citoplasmático.

SREEVATSAN *et al.* (1997b) avaliaram os níveis de resistência ao etambutol apresentado por 19 cepas E resistentes e analisaram a sequência do gene operon *embCAB*. O sequenciamento do DNA e a análise do SSCP permitiram o estudo da RDR, que demonstrou ser idêntica para todas as cepas estudadas. Entretanto, 50,0% das cepas, ou seja, 8/16, apresentaram mutações na posição 306 metionina substituída por isoleucina ou valina. Apreciações posteriores, utilizando sequenciamento automático do DNA da RDR de 69 isolados resistentes e 30 sensíveis, evidenciaram que 69,0% das cepas resistentes apresentavam substituições de aminoácidos na posição 306. Outras mutações foram identificadas nas posições 285, 330 e 630. As mutações que corresponderam às substituições Met306Leu, Met306Val, Phe330Val e Thr630Ile apresentaram CIM mais elevadas (> 40µg/mL) que a substituição Met306Ile (20µg/mL) (LEE *et al.*, 2004).

No Brasil, RODRIGUES (2005), estudando 39 cepas resistentes ao E oriundas dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Porto Alegre, observou que 23 dessas (58,9 %) apresentavam alterações no fragmento de *embB* analisado.

Nesse estudo, foram identificadas dez cepas resistentes ao E e, dessas, sete analisadas quanto à mutação do gene *embB*, através do sequenciamento automático do DNA. Observou-se mutação do gene *embB* em 71,4% das cepas

estudadas (5/7), reforçando resultados de publicações anteriores em que a frequência média de mutação do gene para cepas E resistentes varia em torno de 70%. Duas cepas resistentes não apresentaram mutação no códon 306, sendo possível a ocorrência de alterações em outras regiões não avaliadas neste estudo, a exemplo dos códons 467, 745, 959 e 1024 dentre outros identificados em outras publicações (LEE *et al.*, 2004 e RAMASWAMY *et al.*, 2000). É possível, também, que a resistência possa estar relacionada a outros mecanismos como efluxo da droga ou alteração de permeabilidade da célula.

Considerando-se o tipo de mutação identificada em nosso estudo, em todas aquelas que ocorreram no códon preferencial 306 observou-se a substituição do aminoácido metionina por isoleucina, leucina ou valina, respectivamente em 60,0% (3/5), 20,0% (1/5) e 20,0% (1/5) das cepas. Segundo dados da literatura, referente a estudos desenvolvidos em diferentes países, a ocorrência de mutação do *embB* no códon 306 com a substituição da metionina varia de cerca de 50,0% (MOKROUSOV *et al.*, 2002) a 89% (SREEVATSAN *et al.*, 1997b). Em conformidade com esses resultados, tem-se estudo nacional elaborado por RODRIGUES *et al.* (2005) que apresenta frequência de mutação no códon preferencial de 59,0%, sendo a substituição da metionina por isoleucina a mais frequente (48,0%), seguida da Val (39,0%) e Leu (13,0%).

A análise da CIM dos isolados resistentes, em que foi determinado nível quantitativo de resistência, demonstrou que a maioria das cepas apresentou CIM ≥ 16 ug/mL (87,5%, ou seja, 7/8), havendo boa correlação com a mutação.

6.5 Tuberculose resistente: o cenário

O controle da doença TB ainda incita preocupações. Entre os anos de 1982 e 1986 observou-se um expressivo aumento da TB resistente no mundo e, posteriormente, no início dos anos de 1990 em Nova York, surtos de transmissão nosocomial de cepas *M. tuberculosis* resistentes demonstraram o despreparo dos serviços de

saúde, salientado pelo atraso no diagnóstico, tratamento ineficaz, e pela elevada mortalidade e disseminação. A década de 1990 foi marcada pelo recrudescimento da TB e da multirresistência. A década vigente, pelo esforço na melhoria da vigilância, na implementação de laboratórios de referência, uso de tecnologia molecular no diagnóstico, estímulo ao tratamento supervisionado e melhoria do suporte, com a formação de aliança global para o controle da TB e desenvolvimento de novas drogas. No Brasil, a criação da REDE-TB em 2001, impulsionou maior sistemática na abordagem. Ressalta-se que o panorama da doença na atualidade reflete a evolução adaptativa da micobactéria com a emergência de resistência-multirresistência e, mais recentemente, em 2006, com a TB extremamente resistente (XDR), onde as cepas são resistentes tanto as drogas de primeira escolha, quanto às duas classes de medicamentos de segunda escolha, tornando impossível o tratamento da doença com as drogas disponíveis. Portanto, o diagnóstico de resistência e os medicamentos existentes para o tratamento não são adequados para o manejo de todos os casos, fato que incentiva o desenvolvimento de testes rápidos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION 2006; DALCOMO, ANDRADE, PICON 2007)

Assim, nas últimas décadas com o aumento do interesse pela TB resistente, o número de publicações expressa a repercussão acadêmica desse empenho.

Até o ano de 2000, a maioria das mutações gênicas associadas à resistência já havia sido descrita e os mecanismos estudados, mesmo que não totalmente elucidados, através da PCR seguida do sequenciamento do DNA, SSCP ou RFLP. Esses estudos inicialmente contemplavam número limitado de cepas, resistentes e sensíveis geralmente a apenas uma droga anti-TB, além de avaliarem regiões geográficas específicas. (BLANCHARD 1996, RAMASWAMY, MUSSER 1998, RATTAN *et al.*, 1998).

Após o ano de 2000, observa-se a tendência de estudos com maior amostragem (BOLOTIN *et al* 2009; LIPIN *et al* 2007; MARTTILA *et al* 2008), a análise de genes em combinação (ABDELAAL *et al* 2009; DALLA COSTA *et al* 2009, SEKIGUCHI *et*

al 2007), a diversificação dos recursos tecnológicos, a exemplo do PCR-multiplex, biochip entre outros (ANTONOVA *et al* 2008; BERGVAL *et al* 2008; FU, SHINNICK 2007; GEGIA *et al* 2008; PIETZKA *et al* 2009), e a disponibilização e utilização de testes comerciais (BWANGA *et al* 2009; CAUSSE *et al* 2008; HAUCK *et al* 2009; LACOMA *et al* 2008; MIOTTO *et al* 2008; PALUCH-OLEN *et al* 2009; SHAH *et al* 2009; SOMOSKOVI 2006; WHO 2008).

Outro aspecto é a necessidade de incremento de métodos rápidos e eficazes para a identificação de cepas XDR. Nesse sentido, progressos recentes têm sido alcançados com técnicas moleculares (FEUERRIEGEL *et al* 2009; SUN *et al* 2008).

6.6 Limitações

Neste estudo, foram identificadas 24 cepas resistentes para uma amostragem de 76 isolamentos de pacientes provavelmente portadores de tuberculose resistente. Apesar do limitado número de cepas estudadas, considera-se que foram incluídas cerca de 60% das cepas MDR notificadas do Estado de Minas Gerais do período do estudo. Contudo, sugere-se que estudo prospectivo ampliado seja conduzido a fim de confirmar os resultados. Ressalte-se, ainda, que ocorreram perdas durante o cultivo, fato que impossibilitou análise gênica de toda amostragem.

Em relação à avaliação quantitativa da resistência (CIM), considerando-se que estudos similares utilizam valores de corte distintos e não padronizados, a avaliação comparativa é restrita.

O sequenciamento do DNA é tido como técnica de escolha para a avaliação de mutações, pois além de definir o local da mutação também estabelece se houve substituição, deleção ou inserção de nucleotídeos. No entanto, este método não está frequentemente disponível e estuda somente uma porção do DNA por vez. Outros mecanismos de resistência, a exemplo de bombas de efluxo, também não são identificados por este método. Além disso, pode haver mutação sem resistência manifesta. Neste estudo, apenas para o gene *rpoB*, utilizou-se outro

método para identificação de mutação. Não foi possível realizar sequenciamento para esse gene devido à dificuldade para obtenção de *primers*.

6.7 Propostas

- Implementar pesquisas para estabelecer a real incidência de mutações gênicas associadas à resistência no Estado. Esse dado será útil para o desenvolvimento de método molecular para identificação rápida do portador de cepa MDR, a exemplo de PCR multiplex combinado, *microarray* e *DNAchip*. Sugere-se, contudo, que se utilize como marcadores os genes *katG* e *rpoB*, em associação;
- Considerar ampliação do estudo do gene *rpoB*, como *screening test* para as cepas do Estado de Minas Gerais, a fim de verificar tendência, já que a frequência dessa mutação em cepas R resistentes foi de 78%. Comenta-se que o teste utilizado nesse estudo demonstra a ocorrência ou não de mutação do códon 531 e estuda apenas a RDR;
- Avaliar custo-efetividade da utilização de marcadores moleculares de resistência, para aqueles pacientes de maior risco;
- Determinar faixas precisas para estratificação de resistência de baixo e alto grau;
- Avaliar o uso de detecção de mutações em ambiente hospitalar para verificar a ocorrência de surtos;
- No contexto político-administrativo, priorizar o desenvolvimento de um centro de referência estadual para realização de TS e veiculação de informações referentes à distribuição de casos de TB resistente para região.

6.8 Comentários

Este trabalho permite maior conhecimento das alterações fenotípicas e genotípicas de cepas de *M. tuberculosis* resistentes do Estado de Minas Gerais, e que sua continuação, com a inclusão de número maior de isolados, possa no futuro estabelecer se a utilização de marcadores moleculares de resistência na rotina constitui instrumento eficaz na promoção de real benefício para a comunidade, como foi sugerido neste e em outros estudos similares.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. Cepas de *M. tuberculosis* resistentes às drogas anti-TB isoladas de pacientes atendidos em Unidade de complexidade terciária estão frequentemente associadas àqueles com passado de TB e exposição prévia aos tuberculostáticos. Nessa condição, a resistência adquirida foi quatro vezes mais frequente que a resistência primária.
2. O teste de sensibilidade qualitativo revelou que as cepas estudadas apresentaram maior frequência de resistência à isoniazida e rifampicina. Observou-se elevado índice de resistência combinada, ou seja, a mais de uma droga. A maioria das cepas resistentes foi MDR e grande parte dessas apresentaram resistência à todas as drogas testadas, incluídas nos esquemas 1, 1R e 3.
3. A identificação de mutações do *katG* e *ahpC* apresentou elevado índice de detecção de cepas resistentes à H, e frequentemente correlacionaram com CIM elevadas. A mutação do gene *inhA* pode não ser relevante na identificação de cepas resistentes à H, sendo que neste estudo nenhuma cepa resistente à H apresentou mutação do *inhA*.
4. A mutação do gene *rpoB* ocorreu na maioria das cepas resistentes à R, sendo a localização mais frequente no códon 531, correlacionando com CIM elevada.
5. A avaliação de mutação nos genes *katG* e *rpoB*, em combinação, identificou a maioria das cepas MDR, sendo mais eficaz que a avaliação isolada.
6. Das cepas resistentes à Z, a maior parte apresentou mutações do gene *pncA*, distribuídas entre a posição 99 e 175 do gene, e exibiram CIM

elevada. A inatividade da PZase não foi eficiente marcador de resistência à Z, embora tenha apresentado boa correlação com CIM elevada.

7. Cepas resistentes ao E apresentaram, frequentemente, mutação do gene *embB* localizadas no códon 306, sendo a maioria com CIM elevada.
8. A utilização de instrumental molecular se mostrou eficaz na identificação de cepas de *M. tuberculosis* resistentes às drogas anti-TB, apresentando também boa correlação com CIM elevada. Nossos resultados sugerem que a detecção combinada de mutações seja a alternativa mais eficaz na identificação do portador de cepa MDR. Contudo, mais estudos são necessários para confirmar essa tendência, com emprego de amostras de regiões distintas, ampliação do número de casos e contemplando avaliação de custo-efetividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAL, A. T. S.; AHMAD, S; MOKADDAS, E. Variations in the occurrence of the S315T mutation within the *katG* gene in isoniazid-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kuwait. *Microb. Drug Resist.*, v.8, p.99-105, 2002.

ABATE, G. *et al.* Characterization of isoniazid-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of phenotypic properties and mutations in *katG*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.20, p.329-333, 2001.

ABDELAAL A *et al.* Genotypic detection of rifampicin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by DNA sequencing: a randomized trial. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, v.8, p.4, 2009.

AKTAS, E. *et al.* Molecular characterization of isoniazid and rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Malaysia. Turkey. *Microb. Drug Resist.*, v.11, p.94-99, 2005.

AMERICAN THORACIC SOCIETY AND CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v.149, p.1359-1374, 1994.

ANDRADE, M.K. *et al.* Phenotypic and genotypic variant of MDR-*Mycobacterium tuberculosis* multiple isolates in the same tuberculosis episode, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.42, p. 433-437, 2009.

ANDRADE, L.; SOLARI, C.A.; BECKER, R. Persistência da eliminação bacilar em indivíduos tuberculosos matriculados no Laboratório Central de Tuberculose da Guanabara entre 1965 a 1973. *Rev. Div. Nac. Tuberc.*, v.19, p.85, 1975.

ANTONOVA O. V. *et al.* Detection of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genome determining resistance to fluoroquinolones by hybridization on biological microchips. *Bull Exp Biol Med.*, v.145. p.108-13, 2008.

BANERJEE, A. *et al.* *InhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *M. tuberculosis*. *Science*, v.263, p.227-230, 1994.

BARCO, P. *et al.* *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the southeast region of Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.58, p.930-935, 2006.

BARNES, P.F. The influence of epidemiologic factors on drug resistance rates in tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v.136, p.325-328 1987.

BARNES, P.F. *et al.* Patterns of tuberculosis transmission in Central Los Angeles. *JAMA* , v.278, p.1159-1163, 1997.

BARNES, P.F; CAVE, D. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N. Engl. J. Med.*, v.349, p.1149-1156, 2003.

BARRETO, A.M.W. *et al.* Evaluation of indirect susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to the first- and second-line, and alternative drugs by the newer MB/BacT System. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.98, p.827-830, 2003.

- BARROSO, E.C. *et al.* Fatores associados aos tratamentos inadequados em grupo de portadores de tuberculose multirresistente. *J. Pneumol.*, v.29, p.350-357, 2003 a.
- BARROSO, E.C. *et al.* Fatores de risco para tuberculose multirresistente adquirida. *J. Pneumol.*, v.29, p.89-97, 2003 b.
- BASSO, L.A., *et al.* Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Am. Chem. Soc.*, v.116, p.7425-7426, 1998.
- BELANGER, A.E. *et al.* The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.93, p.11919–11924, 1996.
- BERGVAL I. L. *et al.* Development of multiplex assay for rapid characterization of *Mycobacterium tuberculosis* *J. Clin Microbiol.*, v. 46, p. 689–699, 2008.
- BIFANI, P.J. *et al.* Origin and interstate spread of a New York city multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA*, v.275, p.452-457, 1996.
- BIFANI, P.J. *et al.* 2002. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.* v.10, p.45-52, 2002.
- BLACKWOOD, K.S. *et al.* Conventional and molecular epidemiology of tuberculosis in Manitoba. *BMC Infect. Dis.*, v.3, p.18-24, 2003.
- BLANCHARD, J.S. Molecular mechanisms of drug resistance in *M. tuberculosis*. *Ann. Rev. Biochem.*, v.65, p.215-239, 1996.
- BLOCH, A.B. *et al.* Nationwide survey of drug-resistant tuberculosis in United States. *JAMA*, v.271, p.665-671, 1994.
- BLOOM, B.R.; MURRAY, C.J.L. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*, v.257, p.1055–1064, 1992.
- BODMER, T. *et al.* Mutation position and type of substitution in the β subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* v.35, p.345-48, 1995.
- BOLOTIN S., *et al.* Molecular characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ontario, Canada. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.64, p.263-266, 2009.
- BRAGA, J.U.; BARRETO, A.W; HIJJAR, M.A.. Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil. *Bol. Pneumol. Sanit.*, v.11, p.76-81, 2003.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. I Consenso Brasileiro de Tuberculose -1997. *J. Pneumol.*, v.23, p. 281-342, 1997.
- BRASIL, Ministério da Saúde. FUNASA. Comitê Técnico Científico de Assessoramento a Tuberculose. *Guia de vigilância epidemiológica*. 5.ed. Brasília: Ministério da Saúde/FUNASA, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro de Tuberculose. *J. Bras. Pneumol.*, v.30, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde/FUNASA/CENEPI. *Taxa de Incidência de Tuberculose*. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2002/d0202.def>> Acesso em: 15 de dezembro de 2004.

BRITO, R.C. *et al.* Resistência aos medicamentos antituberculose de cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em hospital geral de referência para o tratamento de AIDS no Rio de Janeiro. *J. Bras. Pneumol.*, v.30, p.425-432, 2004.

BURMAN, W.J.; REVES, R.R. Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment. *Clin. Infect. Dis.*, v.31, p.1390-1395, 2000.

BWANGA F *et al.* Direct susceptibility testing for multidrug resistant tuberculosis: a meta analysis. *BMC Infectious Diseases.*, v.9, p.67, 2009.

CAMPOS, S. *Mycobacterium tuberculosis* resistente. De onde vem a resistência? *Bol. Pneum. Sanit.*, v.7, p.51-64, 1999.

CAMUS, J.C. *et al.* T. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, v.148, p.2967-2973, 2002.

CANETTI, G.; RIST, N.; GROSSET, J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Méthodologie, critères de résistance, résultats, interprétation. *Rev. Tuberc. Pneumol (Paris)*, v.27, p.217-272, 1963.

CANETTI, G. The J. Burns Amberson lecture: present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v. 92, p.687-703, 1965.

CANETTI, G.; GROSSET, J. Techniques et indications des examens bactériologique em tuberculose. *St. Mande Editions de la Tourelle*, 1968. In: ANDRADE, L. Micobactérias atípicas. Micobacterioses, etiopatogenia, diagnóstico, tratamento e epidemiologia. *J. Pneumol.*, v.12, p.241-248, 1986.

CARDOSO R.F. *et al.* Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.48, p. 3373-3381, 2004.

CARDOSO, R.F. *et al.* Characterization of *ndh* gene of isoniazid resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.102, p.59-61, 2007.

CARRICAJÓ, A. *et al.* Mycobacterial cross-contamination of broncoscope detected by molecular techniques. *J. Hosp. Infect.*, v.42, p.252-253, 1999.

CARVALHO, W.S. *et al.* Low-stringency single-specific-primer PCR as a tool for detection of mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, p.3384-3386, 2003.

CASTRO, A.F.P.; TRABULSI, L.R. Micobactérias e nocárdias. In: TRABULSI, L.R. (Ed). *Microbiologia*. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991. p. 187-197.

CAUGANT D.A. *et al.* Detection of rifampin resistance among isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mozambique. *Microb. Drug. Resist.*, v.1, p.321-326, 1995.

CAUSSE M *et al.* Evaluation of new GenoType MTBDRplus for detection of resistance in cultures and direct specimens of *Mycobacterium tuberculosis*, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v.12, p.1456-60, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, v.42, p.1-8, 1993.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.. Expanded tuberculosis surveillance and tuberculosis morbidity – United States, 1993. *MMWR. Morb Mortal Wkly Rep*, v.43, p.361-395, 1994.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs worldwide *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, v. 55, p.301-305, 2006.

CHANG, C.L., *et al.* False-positive growth of *Mycobacterium tuberculosis* attributable to laboratory contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Tuberc. Lung Dis.*, v.5, p.861-867, 2001.

CHAULK, C.P.; KAZANDJIAN, V.A. Directly observed therapy for treatment completion of pulmonary tuberculosis: Consensus Statement of the Public Health Tuberculosis Guidelines Panel *JAMA*, v.279, p.943-948, 1998.

CHAVES, F. *et al.* *rpoB* mutations as an epidemiologic marker in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v.4, p.765-770, 2000.

CHENG, S. *et al.* *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.44, p.528–532, 2000.

CLEMENTE, W.T. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v.62, p.199-204, 2008.

COCKERILL, F.R. III *et al.* Rapid identification of a point mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* catalase peroxidase (*katG*) gene associated with isoniazid resistance. *J. Infect. Dis.*, v.171, p.240–245, 1995.

COHN, M.L. *et al.* Studies on isoniazid and tubercle bacilli: the growth requirements, catalase activities, and pathogenic properties of isoniazid-resistant mutants. *Am. Rev. Tuberc.*, v.70, p. 641-664, 1954.

COLE, S.T.; TELENTI, A. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. Respir. J.*, v.8 (suppl. 20), p. 701-713, 1995.

COLE, S.T. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, v.393, p.637-644, 1998.

DAHLE, U.R. *et al.* Deciphering an outbreak of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, p. 67-72, 2003.

DALCOMO, M. Serviço de Vigilância Sanitária, MS, julho 2005 (Comunicação pessoal).

DALCOMO, M.P.; ANDRADE, M.K.; PICON, P.D. Multiresistant tuberculosis in Brazil: history and control. *Rev Saúde Pública*, v. 41, p.1-8, 2007.

DALLA COSTA, E.R. *et al.* Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol.*, v.9, p.39-49, 2009.

DAVID, H.L. Probability distribution of drug resistant mutants in unselected populations of *M. tuberculosis*. *Appl. Microbiol.*, v.20, p.810-814, 1970.

DAVID, H.L.; NEWMAN, C.M. Some observations on the genetics of Isoniazid resistance in the tubercle bacilli. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v.104, p.508-515, 1971.

DE BEENHOUWER, H. *et al.* Rapid detection of rifampin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tuber. Lung Dis.*, v.76, p. 425–430, 1995.

DERETIC, V. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with and inactivated oxidative-stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazid. *Mol Microbiol.*, v.17, p.889-900, 1995.

DOBNER, P. *et al.* Usefulness of *Mycobacterium* genomic mutations in the genes *katG* and *inhA* for the prediction of isoniazid resistance. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v.1, p.365-369, 1997.

DOLIN, P.J. *et al.* Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull. World Health Organ.*, v.72, p.213-220, 1994.

DONNABELLA, V. *et al.* Isolation of the gene for the b subunit of RNA polymerase from rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* and identification of new mutations. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, v.11, p. 639–643, 1994.

DROBNIIEWSKI, F.A.; WILSON, S.M. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* – a molecular story. *J. Med. Microbiol.*, v. 47, p.189-196, 1998.

EDLIN, B.R. *et al.* An outbreak of MDR tuberculosis among hospitalized patients with AIDS. *N. Engl. J. Med.*, v.326, p.1514-1521, 1992.

ELLIS, B.A. *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in a sentinel surveillance population. *Emerg. Infect. Dis.*, v.8, p.1197-1209, 2002.

ELLNER, J.J. *et al.* Tuberculosis symposium: emerging problems and promise. *J. Infect. Dis.*, v.168, p.537-551, 1993.

ESCALANTE, P. *et al.* Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tubercle Lung Dis.*, v.79, p.111-118, 1998.

ESPINAL, M.A. *et al.* Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *N. Engl. J. Med.*, v.344, p.1294-1302, 2001.

FANDINHO, F.C.O. *et al.* Drug resistance patterns among hospitalized tuberculous patients in Rio de Janeiro, Brazil, 1993-1994. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.94, p.543-547, 1999.

FANDINHO, F.C.O. *et al.* RFLP patterns and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* V.94, p.271-275, 2000.

FANG, Z. *et al.* Molecular evidence for heterogeneity of the multiple-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* population in Scotland (1990 to 1997). *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.998-1003, 1999.

FARR, S.B.; KOGOMA, T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.*, v.55, p.1-85, 1991.

FERDINAND, S. *et al.* Molecular characterization and drug resistance patterns of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in an AIDS counseling center in Port-au-Prince, Haiti: 1-year study. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, p. 694-702, 2003.

FEUERRIEGEL S *et al.* Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.53, p. 3353-3356, 2009.

FILHO, L.A. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* typing: usefulness of DRE-PCR to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory of a general reference hospital for AIDS. *Int J Tuberc Lung Dis.*, v.6, p.150-4, 2002.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am. J. Epidemiol.*, v.153, p. 7-13, 2001.

FRANÇA, J.L.; VASCONCELLOS, A.C. *Manual para normalização de publicações técnico científicas*. 7. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2004, p.242.

FRENCH, A.L. *et al.* Use of DNA fingerprinting to assess tuberculosis infection control. *Ann. Int. Med.*, v.129, p. 856-861, 1998.

FRIEDEN, T.R. *et al.* Tuberculosis in New York City – turning the tide. *N. Engl. J. Med.*, v.333, p.229-233, 1995.

FRIEDMAN, C.R.; STOECKLE, M.Y.; KREISWIRTH, B.N. Widespread dissemination of a single drug-susceptible strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.*, v.176, p. 478-484, 1997.

FU L. M., SHINNICK T. M. Understanding the action of INH on a highly INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain using genechips. *Tuberculosis.*, v. 87, p. 63-70, 2007.

GARCIA, L. *et al.* Mutation in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Spain and their rapid detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p.1813-1818, 2001.

GEGIA M *et al.* Prevalence of and molecular basis for tuberculosis drug resistance in the Republic of Georgia: validation of a QIAplex system for detection of drug

resistance-related mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 52, p. 725-729, 2008.

GERHARDT FILHO, G.; HIJJAR, M.A. Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Brasil. *J. Pneumol.*, v.19, p.4-10, 1993.

GOBLE, M. Drug resistant tuberculosis. *Semin. Respir. Infect.*, v.1, p.220-229, 1986.

GRANGE, J.M. *Mycobacteria and human disease*. 2nd. ed. London: University Press, 1996. 230p.

HAAS, W.A. *et al.* Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.41, p. 1601–1603, 1997.

HAUCK Y, *et al.* Comparison of two commercial assays for the characterization of *rpoB* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* and description of new mutations conferring weak resistance to rifampicin. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.64, p.259-262, 2009.

HAZBON, M.H. Recent advances in molecular methods for early diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. *Biomedica*, v.24(Suppl.1), p. 149-162, 2004.

HEIFETS, L. Qualitative and quantitative drug susceptibility tests in mycobacteriology. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v.137, p.1217-1222, 1988.

HEIFETS, L.; LINDHOLM-LEVY, P. Comparison of bacterial activities of streptomycin, amikacin, kanamycin and capreomycin against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.33, p.1298-1301, 1989.

HEIFETS, L. False diagnosis of tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v.5, p. 789-790, 2001.

HEYM, B. *et al.* Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet*, v.344, p. 293–298, 1994.

HEYM, B. *et al.* Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.*, v.15, p. 235–245, 1995.

HIJJAR, M.A.; OLIVEIRA, M.J.P.R.; TEIXEIRA, G.M. A tuberculose no Brasil e no mundo. *Bol. Pneumol. Sanit.*, v.9, p.9-16, 2001.

HIRANO, K. *et al.* Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc. Lung Dis.*, v.78, p.117–122, 1997.

HIRANO K.; ABE C.; TAKAHASHI M. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in the Asian countries and their rapid detection by line probe assay *J. Clin. Microbiol.* ; v.37, p.2663-2666, 1999.

HOFLING, C.C. *et al.* Prevalence of *katG* Ser315 substitution and *rpoB* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v.9, p.87-93, 2005.

INDERLIED, C.B.; NASH, K.A. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing, spectra of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biologic fluids. In: LORIAN, V. (Ed.). *Antibiotics in laboratory medicine*. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p. 127-175.

ISEMAN, M.D.; SBARBARO, J.A. The increasing prevalence of resistance to antituberculosis chemotherapeutic agents implications for global tuberculosis control *Curr. Clin. Trop. Infect. Dis.*, v.12, p.188-207, 1992.

ISEMAN, M.D. Drug resistance tuberculosis. In: _____. *A clinician's guide to tuberculosis*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000 a, cap. 11, p. 323-353.

ISEMAN, M.D. Tuberculosis chemotherapy, including directly observed therapy. In: _____. *A clinician's guide to tuberculosis*. Philadelphia-USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000 b, cap. 10, p. 271-321.

ISEMAN, M.D. Tuberculosis down through the centuries In: _____. *A clinician's guide to tuberculosis*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000 c, cap. 1, p. 1-19.

ISEMAN, M.D. Tuberculosis epidemiology. In: _____. *A clinician's guide to tuberculosis*. Philadelphia-USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000 d, cap. 5, p. 97-128.

IUATLD. Infection and disease among household contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, v.5, p.321-328, 2001.

JACOBS JR, W.R.; BLOOM, B.R. Molecular genetic strategies for identifying virulence determinants of *M. tuberculosis*. In: BLOOM, B.R. (Ed). *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington, DC: ASM Press, 1994. p. 253-268.

JACOBS, R.F. Multiple-drug-resistant tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.*, v.19, p.1-10, 1994.

JASMER, R.M. *et al.* A prospective, multicenter study of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures. *Emerg. Infect. Dis.*, v.8, p. 1260-1263, 2002.

JASSAL M; BISHAI W.R Extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis*; v. 9, p.19-30, 2009.

JEREB, J.A. *et al.* Tuberculosis in health care workers at a hospital with an outbreak of multidrug-resistant *M. tuberculosis*. *Arch. Intern. Med.*, v.155, p.854-859, 1995.

JOHNSON, D.C. *et al.* Epidemiologic notes and reports expanded tuberculosis surveillance and tuberculosis morbidity -- United States, 1993. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, v.43, p.361-366, 1994.

KANDUMA, E. *et al.* Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J. Applied Microbiol.*, v.94, p.781-791, 2003.

KAPUR, V. *et al.* Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase β subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York city and Texas. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, p.1095–1098, 1994.

KAPUR, V. *et al.* Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.119, p. 131–138, 1995.

KELLEY, C.L. *et al.* Analysis of *ahpC* gene mutations in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.41, p.2057-2058, 1997.

KIEPIELA, P. *et al.* Genomic mutations in the *katG*, *inhA* and *ahpC* genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from KWAZULU natal, South Africa. *Tuberc Lung Dis*; v.80, p. 47-56, 2000.

KOCHI, A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the WHO. *Tubercle*, v.72, p.1-6, 1991

KONG, P.M. *et al.* Skin-test screening and tuberculosis transmission among homeless. *Emerg. Infect. Dis.*, v.8, p.1280-1284, 2002.

KONNO, K.; NAGAYAMA, H. ;OKA, S. Nicotinamidase in mycobacteria: um method for distinguishing bovine type tubercle bacilli from other mycobacteria. *Nature*, v.184, p. 1743-1744, 1959.

KONNO, K.; FELDMAN, M.; McDERMOTT, W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v.95, p.461-469, 1967.

KRITSKI, A.L. *et al.* Transmission of tuberculosis of close contacts of patients MDR-TB *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v.153, p.331-335, 1996.

KRITSKI, A.L.; SILVA, J.R.L.; CONDE, M.B. Tuberculosis and HIV: renewed challenge. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.93, p.427-441, 1998.

KRITSKI, A.L.; CONDE, M.B.; SOUZA, G.R.M. *Tuberculose – Do ambulatório à enfermaria*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 303p.

KRITSKI, A.L. Co-infecção *M. tuberculosis*/HIV. In.: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*, 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 947-953.

KRITSKI, A.L. *et al.* Duas décadas de pesquisa em tuberculose no Brasil: estado da arte das publicações científicas. *Rev. Saude Pública*, v.41, (supl.1), p.9-14, 2007.

KUBIN, M.M. *et al.* A multidrug-resistant tuberculosis microepidemic caused by genetically closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p. 2715-2716, 1999.

LACOMA, A. *et al.* GenoType MTBDRplus assay for molecular detection of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* v. 46, p.3660-3667, 2008.

- LEE, A.S. *et al.* Novel mutations within the *embB* gene in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.48, p.4447-4449, 2004
- LEE, K.W.; LEE, J.M.; JUNG, K. Characterization of *pncA* mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *J. Korean Med Sci.*, v.16, p.537-543, 2001
- LEMAITRE, N.; SOUGAKOFF, W. TRUFFOT-PERNOT, C. Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase *pncA*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.43, p.1761-1763, 1999.
- LESSNAU, K.D.; GORLA, M.; TALAVERA, W. Radiographic findings in HIV-positive patients with sensitive and resistant tuberculosis. *Chest*, v.106, p. 687-689, 1994.
- LIBERATO, I.R. *et al.* Characteristics of pulmonary tuberculosis in HIV seropositive and seronegative patients in a Northeastern region of Brazil. *Rev. Soc. Bras Med. Trop.*, v.37, p.46-50, 2004.
- LIMA FILHO, M.T. *et al.* Resistência primária do *Mycobacterium tuberculosis* no Brasil. *AMB Rev. Ass. Med. Bras.*, v.26, p.182-184, 1980.
- LIMA, M.M. *et al.* HIV/tuberculosis co-infection: a request for a better surveillance. *Rev. Saúde Pública*, v.31, p.217-220, 1997.
- LIN, R. *et al.* Transmission patterns in Taiwan: analysis by restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Infect. Dis.*, v.1, p.18-21, 1996.
- LIPIN M. Y. *et al.* Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.13, p.620-626, 2007.
- LUCAS, S.; NELSON, A. Pathogenesis of tuberculosis in human immunodeficiency vírus infected people. In: BLOOM, B.R. ed. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington: American Society of Microbiology, 1994. p. 503-513.
- MACKANESS, G.B. The intracellular activation pyrazinamide and nicotinamide. *Am. Rev. Tuberc.*, v.74, p.718-728, 1956.
- MAGARÃO, M.F. *et al.* Informações sobre a frequência da resistência do *M. tuberculosis* às drogas standard no Rio de Janeiro entre 1958 a 1966. *Rev. Serv. Nac. Tub*, v.11, p.435, 1967.
- MAHMOUDI, A.; ISEMAN, M.D. Pitfalls in the care of patients with tuberculosis. *JAMA*, v.270, p.65-68, 1993.
- MANI, C. *et al.* Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, p.2987-2990, 2001.
- MARRA, U.D. O problema da resistência bacteriana na tuberculose em Belo Horizonte. *Hospital*, v.71, p.1413, 1967.
- MARTTILA, H.J.; SOINI, H.; HUOVINEN, P. *katG* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from finish patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.40, p. 2187-2189, 1996.

MARTTILA, H.J. *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.*, v.42, p. 2443-2445, 1998.

MARTTILA, H.J. *et al.* *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.43, p.1764–1786, 1999.

MARTTILA H. J. *et al.* Molecular genetics of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Finland, 1995-2004. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v.12, p. 338-343, 2008.

MASLOW, J.N.; MULLIGAN, M.E.; ARBEIT, R.D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis.*, v.17, p.153-164, 1993.

MATSIOTA-BERNARD, P.; VRIONI, G.; MARINIS, E. Characterization of *rpoB* mutation in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. *J. Clin. Microbiol.*, v.36, p.20-23, 1998.

McCLATCHY, J.K.; TSANG, A.Y.; CERNICH, M.S. Use of pyrazinamidase activity in *Mycobacterium tuberculosis* as a rapid method for determination of pyrazinamide susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.20, p. 556–557, 1981.

McCLURE, W.R.; CECH, C.L. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J. Biol. Chem.*, v.253, p. 8949-8956, 1978.

McDERMOTT, W. *et al.* Streptomycin in the treatment of tuberculosis in humans. *Ann. Intern. Med.*, v.27, p.769-822, 1947.

McDERMOTT, W.; TOMPSETT, R. Activate of pyrazinamide and nicotinamide in acid environment in vitro. *Am Rev Tuberc.*, v.70, p. 748-754, 1954.

McNABB, S.J.N. *et al.* DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: lessons learned and implications for the future. *Emerg. Infec. Dis.*, v.8, p. 1314-1318, 2002.

MDLULI, K. *et al.* Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science*, v. 280, p.1607-1610, 1998.

MELO, F.A.F. *et al.* Resistência primária do *M. tuberculosis* num serviço ambulatorial de referência em São Paulo: evolução por três décadas e comparação com estudos nacionais. *J. Bras. Pneumol.*, v. 22, p.3-8, 1996.

MESTDAGH, M. *et al.* Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity, and mutations in the *pncA* locus in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.43, p.2317-2319, 1999.

MIDDLEBROOK, G.; COHN, M.I.; SCHAEFER, W.B. Studies on isoniazid and tubercle bacilli. III The isolation, drug-susceptibility and catalase-testing of tubercle bacilli from isoniazid-treated patients. *Am. Rev. Tuberc.*, v.70, p.852-872, 1954.

MIESEL, L. *et al.* NADH dehydrogenase defects confer isoniazid resistance and conditional lethality in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.*, v.180, p.2459-2467, 1998.

MINGEOT-LECLERC, M.P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P.M. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.43, p.727-737, 1999.

MIRANDA, S.S. *et al.* Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Brazil and France. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p.247-250, 2001

MIOTTO, P *et al.* Genotype MTBDR_{plus}: a further step toward rapid identification of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, v.46, p.393-394, 2008.

MOGHAZEH, S.L. *et al.* Comparative antimicrobial activities of rifampin, rifapentine, and KRM-1648 against a collection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.40, p.2655–2657, 1996.

MOKROUSOV, I. *et al.* High prevalence of *katG* Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.46, p.1417-1424, 2002.

MORLOCK, G.P. *et al.* Phenotypic characterization of *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.44, p.2291-2295, 2000.

MORRIS, S.L. *et al.* Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.*, v.171, p.954–960, 1995.

MOSS, A.R.D. *et al.* A city-wide outbreak of a multiple-drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* in New York. *Int. J. Tub. Lung Dis.*, v.1, p.115-121, 1997.

MUNSIFF, S.S. *et al.* Molecular epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis, New York City, 1995-1997. *Emerg. Infect. Dis.*, v.8, p.1230-1238, 2002.

MUSSER, J.M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.8, p.496-514, 1995.

MUSSER, J.M. *et al.* Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J. Infect. Dis.*, v.173, p.196-202, 1996.

NATAL, S. *et al.* Resistência à isoniazida e rifampicina e história de tratamento anterior para tuberculose. *Cad. Saúde Pública*, v.19, p.1277-1281, 2003.

NEVILLE, K. *et al.* The third epidemic-multidrug-resistant tuberculosis. *Chest*, v.105, p.45-48, 1994.

O'BRIEN K.L. *et al.* Evaluation of *inhA* gene and catalase-peroxidase gene among isoniazid-sensitive and resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Mol. Cell Probes*, v.10, p.1-6, 1996.

OHNO, H. *et al.* Relationship between rifampin MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.40, p.1053-1056, 1996.

OHNO, H. *et al.* Rapid prediction of rifampin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v.155, p.2057-2063, 1997.

- OPRAVIL, M. Epidemiological and clinical aspects of mycobacterial infections. *Infection*, v.25, p.56-61, 1997.
- PABLOS-MENDEZ, A. *et al.* Global surveillance for antituberculosis – drug resistance 1994-1997. WHO – International Union Against Tuberculosis and Lung Disease working group on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. *N. Engl. J. Med.*, v.338, p.1641-1649, 1998.
- PALACI, M. *et al.* Quimioterapia da tuberculose: Fundamentos, regimes e resistência bacteriana. *Rev Cienc Farm.*, v.18, p.29-40, 1997.
- PALUCH-OLEŚ J, *et al.* Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Eastern Poland. *New Microbiol.*, v.32, p.147-152, 2009.
- PARK, S.K. *et al.* *pncA* mutations in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. *Bio Med. Central Infect. Dis.*; v.1, p.4, 2001.
- PEREZ-GUZMAN C.; VARGAS M.H.; TORRES-CRUZ, A. Does aging modify pulmonary tuberculosis? *Chest*, v.116, p. 961-967, 1999.
- PIETZKA A. T. *et al.* Rapid identification of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by *rpoB* gene scanning using high-resolution melting curve PCR analysis. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 63, p.1121-1127, 2009.
- PINTO, W.P. *et al.* Antimicrobial resistance of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from HIV infected patients in the city of São Paulo (Brazil): resistance profile. *Tubercle Lung Dis.*, v.76(suppl. 2):141A, 1995.
- PINTO, W.P. *et al.* Drug resistance of *M. tuberculosis* isolated from patients with HIV infection seen at an AIDS reference center in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.38:15-22, 1996.
- PINTO W.P. *et al.* Tuberculosis and drug resistance among patients seen at an AIDS reference center in São Paulo, Brazil. *Int J Infect Dis.*; v.5 , p.93-100, 2001.
- PORTUGAL, I *et al.* *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.7, p.2736-2738, 2004.
- POZZI, G. *et al.* *rpoB* mutations in multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Italy. *J Clin Microbiol.*, v.37, p. 1197–1199, 1999.
- PRETORIUS, G.S. *et al.* Mutations in *katG* gene sequences in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* are rare. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.39, p.2276-2278, 1995,
- RAMASWAMY, S.V.; MUSSER, J.M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle Lung Dis.*, v.79, p. 3-29, 1998.
- RAMASWAMY, S.V. *et al.* Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v.44, p.326-336, 2000.

- RAMASWAMY, S.V. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.47, p. 1241-1250, 2003.
- RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg. Infect. Dis.*, v.4, p.195-207, 1998.
- RAVIGLIONE, M.C.; SMITH, I.M. XDR Tuberculosis – Implications for Global Public Health. *N. Engl. J. Med.*, v.356, p.656-659, 2007.
- RINDER, H. *et al.* Disequilibria in the distribution of *rpoB* alleles in rifampicin – resistant *M. tuberculosis* isolates from Germany and Sierra Leone. *Microbiol. Drug Resist.*, v.3, p.195-197, 1997.
- RINDER, H. *et al.* Detection of *embB* codon 306 mutations in ethambutol resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum samples: a low-cost, rapid approach. *Mol. Cell Probes*, v.15, p.37-42, 2001.
- RODRIGUES, V.F.S. *et al.* Characterization of *pncA* mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.49, p.444-446, 2005.
- RODRIGUES, V.F.S. Caracterização de mutações associadas com a resistência à pirazinamida e etambutol em isolados de *Mycobacterium tuberculosis*. 2005. f.113. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- ROSEMBERG, J.; WAISBICH, E. Resistência às drogas standard em 1759 casos de tuberculose pulmonar, bacilíferos, submetidos à quimioterapia por tempos diversos. *Rev. Serv. Nac. Tubercul.*, v.2, p.440-466, 1967.
- ROSSETTI, M.L. *et al.* Tuberculose resistente: revisão molecular. *Rev. Saúde Pública*, v.36, p.525-532, 2002.
- ROUSE, D.A. *et al.* Characterization of the *katG* and *inhA* genes of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.39: 2472–2477, 1995.
- ROUSE, D.A. *et al.* Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol. Microbiol.*, v.22, p.583–592, 1996.
- ROZWARSKI, D.A. *et al.* Isoniazid modifies the NADH of its target enzyme (*InhA*) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, v.279, p. 98–102, 1998.
- RUFFINO NETO, A.; HIJJAR M.A. Destaques da avaliação do programa nacional de controle da tuberculose *Bol.Pneum. Sanit.*, v.5, p.59-62, 1997.
- SALEM, J.I. *et al.* An investigation of primary and acquired drug-resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Manaus (Amazonas, Brazil). *J. Pneumol.*, v.16, p. 6-8, 1990.
- SALFINGER, M.; HEIFETS, L.B. Determination of pyrazinamide MICs for *Mycobacterium tuberculosis* at different pHs by the radiometric method. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.32, p. 1002–1004, 1988.

SCORPIO, A.; ZHANG, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat. Med.*, v.2, p.662-667, 1996.

SCORPIO, A. *et al.* Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.41, p.540-543, 1997.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE/MINAS GERAIS. Taxa de incidência de casos novos de tuberculose, formas pulmonares positivas e todas as formas, no período de 1995 a 2002, no Estado de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br:80/saude/viewController.jsp?page=46>> Acesso em 20 abr 2004.

SEKIGUCHI, J. *et al.* Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* v.45, p. 179-192, 2007.

SENNA, S.G. *et al.* In house reverse line hybridization assay for rapid detection of susceptibility to rifampicin in isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods.*, v.67, p.385-389, 2006.

SHAHER, R.W. *et al.* Temporal trends and transmission patterns during the emergence of multidrug resistant tuberculosis in New York City: a molecular epidemiologic assessment. *J Infect. Dis.*, v.171, p.170-176, 1995.

SHAH NS *et al.* Validation of the line-probe assay for rapid detection of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis.*, v.13, p.247-252, 2009.

SHERMAN, D.R. *et al.* Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.92, p.6625-6629, 1995.

SHERMAN, D.R. *et al.* Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, v. 272, p.1641-1643, 1996.

SILVA, E.A.M. *et al.* Perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* no Estado de São Paulo, 1986 a 1990. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.52, p.37-40, 1992.

SILVA, M.S.N. *et al.* Mutations in *katG*, *inhA* and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, p.4471-4474, 2003.

SILVA, P.E.A. *et al.* Drug resistance of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Brazil. *Microbes Infect.*, v.3, p.1111-1113, 2001.

SINGAPORE TUBERCULOSIS SERVICE. British Medical Research Council. Clinical trial of six-month and four-month regimens of chemotherapy in the treatment of pulmonar tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.41, p.540-543, 1981.

SLAYDEN, R.A.; BARRY, C.E. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*, v.2, p. 659-669, 2000.

SMALL, P.M.; MOSS, A. Molecular epidemiology and the new tuberculosis. *Infect. Agents Dis.*, v.2, p. 132-138, 1993.

SMALL, P.M. *et al.* The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N. Engl. J. Med.*, v.330, p. 1703-1709, 1994.

SNIDER JR, D.E. *et al.* Successful intermittent treatment of smear positive pulmonary tuberculosis: the results up to 30 months. *Tubercle*, v.62, p.95-102, 1982.

SNIDER JR, D.E.; ROPER, W.L. The new Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.*, v.326, p.703-705, 1992.

SOINI, D.; MUSSER, J. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin. Chem.*, v.47, p.809-814, 2001

SOMOSKOVI, A.; PARSONS, L.M.; SALFINGER, M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir. Res.*, v.2, p.164-168, 2001.

SOMOSKOVI A *et al.* Use of smear-positive samples to assess the PCR-based genotype MTBDR assay for rapid, direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin. *J Clin Microbiol.*, v.44, p. 4459-4463, 2006.

SPIES, F.S. *et al.* Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.52, p.2947-2949, 2008.

SREEVATSAN, S. *et al.* Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.41, p.636-40, 1997a.

SREEVATSAN, S. *et al.* Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.41, p.1677-81, 1997b.

SUDRE, P.; DAM, G.T.; KOCHI, A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull. World Health Organ.*, v.70, p.149-159, 1992.

SUFFYS, P.N.; ARAÚJO, M.E.I.; DEGRAVE. W.M. The changing face of the epidemiology of tuberculosis due to molecular strains typing – a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.92, p.297-316, 1997.

SUN Z *et al.* Characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in China. *J. Clin. Microbiol.* v. 46., p. 4075-4077, 2008.

SUZUKI, Y. *et al.* Rapid detection of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by a PCR-based in vitro system. *J Clin Microbiol.*, v.2, p.501-507, 2002.

TAKAYAMA, K. *et al.* Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.16, p.240-2, 1979.

TAKAYAMA, K.; KILBURN, J.O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.33, p.1493-9, 1989.

- TANIGUCHI, H. *et al.* Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* *FEMS Microbiol Lett.*, v.144, p. 103-108, 1996
- TARANTINO, A.B.; LEITÃO DE OLIVEIRA, M. C. Tuberculose. *Arq. Bras. Med.*, v.64, p.123-31, 1990.
- TAVARES, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos, 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2001, 1216p.
- TELENTI, A.F.O. *et al.* Detection of rifampicin – resistance mutations in *M. tuberculosis*. *Lancet*, v.341, p.647-650, 1993.
- TELENTI, A. *et al.* Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, p.719-723, 1997 a.
- TELENTI, A. *et al.* The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nature. Med.*, v.3, p.567-570, 1997 b.
- TENOVER, F.C. *et al.* How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp. Epidemiol.*, v.18, p.426-39, 1997.
- TOLEDO, A. *et al.* Initial drug resistance among pulmonary cases of tuberculosis in 1994 in Rio de Janeiro city. *Tuber Lung Dis.*, v.76(Suppl.2), p. 94, 1995.
- TORREA, G.G. *et al.* Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence IS6110 and the repetitive element DR as strain-specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. *J Clin Microbiol.*, v.33, p.1899-1904, 1995.
- TORRES, M.J.A. *et al.* Rifampin and isoniazid resistance associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Seville, Spain. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v.6, p.160-163, 2002.
- VALIM, A.R.M. *et al.* Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, v.38, p. 3119-3122, 2000.
- VAN DOORN, H.R. *et al.* The susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Isoniazid and the Arg → Leu mutation at codon 463 of *katG* are not associated. *J. Clin. Microbiol.*; v.39, p. 1591-1594, 2001.
- VAN DOORN, H.R. *et al.* Detection of a point mutation associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by using real-time PCR technology with 3' minor groove binder probes. *J. Clin. Microbiol.*; v.41, p.4630-4635, 2003.
- VAN EMBDEN, J.D. *et al.* Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. *Res. Microbiol.*, v.143, p. 385-391, 1992.
- VAN EMBDEN, J.D.A.; CAVE, M.D.; CRAWFORD, J.T. Strain identification of *M. tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.*, 31, p.406-409, 1993.

VAN RIE, A. *et al.* Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high incidence community. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p.636-641, 2001.

VAN SOOLINGEN, D. *et al.* DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol.*, v.235, p.196-204, 1994 .

VAN SOOLINGEN, D. *et al.* Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in The Netherlands. *J. Infect. Dis.*, v.182, p.1788-1790, 2000.

VAN SOOLINGEN, D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Int. Med.*, v.249, p. , p.1-26, 2001.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002, 984p.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, 2388p.

VIEDMA, G.D. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approach. *Clin Microbiol Infect.*, v.9, p.349-359, 2003.

VUKOVIC, D. *et al.* Molecular epidemiology of pulmonary tuberculosis in Belgrade, Central Serbia. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, p.4372-4377, 2003.

WADA, T. *et al.* .Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, p.5277-5285, 2004.

WANG, L.; TAKAYAMA, K. Relationship between the uptake of isoniazid and its action on in vivo mycolic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.2, p.438-441, 1972.

WATTERSON, S.A.; DROBNIEWSKI, F.A. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. *J. Clin. Pathol.*, v.53, p.727-732, 2000.

WAYNE, L.G. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria *Am. Rev. Respir. Dis.*, 109, p.147-151, 1974.

WAYNE, L.G.; KUBICA, G.P. Genus *Mycobacteria*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (Eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9nd ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1986. v. 2. p. 1436-1457.

WILSON, T.M.; COLLINS, D.M. *ahpC*, a gene involved in isoniazid resistance of the *M. tuberculosis* complex. *Mol. Microbiol.*, v.19, p.1025-1034, 1996.

WINDER, F.G.; COLLINS, P. The effect of isoniazid on nicotinamide nucleotide levels in *M bovis* strain BCG. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v.97, p.719-720; 1968.

WINDER, F.G.; COLLINS, P. The effect of isoniazid on nicotinamide nucleotide concentrations in the tubercle *bacilli* *Am. Rev. Respir. Dis.*, v.100, p.1001-1031, 1969.

WINDER, F.G.; COLLINS, P. Mode of action of the antimycobacterial agents and associated aspects of molecular biology of mycobacteria In: RATLEDGE C, STANFORD J. (Eds.) *The biology of the mycobacteria*. New York: Academic Press; 1982. p.353-438.

WOLUCKA, B.A. *et al.* Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. *J. Biol. Chem.*, v.269, p. 23328–23335, 1994.

WOOD, A.J.J. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *N. Engl. J. Med.*, v.329, p.784-790, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antituberculosis drug resistance in the world In: WHO/IUATLD Global Project on drug resistance surveillance, 1994-1997 Geneva: WHO, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World health report 1999 making a difference. Geneva: WHO, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Programme and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease: anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report 2 Prevalence and trends. WHO/CDS/TB/2000-2278. Geneva: WHO, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB). WHO, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. IUATLD. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Fourth global report. WHO/HTM/TB/2008.394. Geneva: WHO, 2008.

YUE, J. *et al.* Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, p.2209-2212, 2003.

ZHANG, N. *et al.* The Emb proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via N-terminal recognition region and C-terminal synthetic region. *Mol. Microbiol.*, v.50, p.69-76, 2003.

ZHANG, Y. *et al.* The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, v.358, p. 591-593, 1992.

ZHANG, Y.; MITCHINSON, D.A. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v.7, p.6-21, 2003.

ZHANG, Y.; TELENTI, A. Genetics of drug resistance in *M. tuberculosis*. In: HATFULL, G.F.; JACOBS, W.R. Jr. *Molecular of mycobacteria*. Washington (DC): ASM Press, 2000. p. 235-254.

ZHAO, J.R. *et al.* Development of a pyrosequencing approach for rapid screening of rifampicin, isoniazid and ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.*, v.9, p.328-332, 2005.

APÊNDICES

9 APÊNDICES

9.1 APÊNDICE A – FICHA DE COLETA DE DADOS

No. do paciente
no. banco de dados:

IDENTIFICAÇÃO:

NOME:

Registro:

1) FICHA NÚMERO:

2) NÚMERO DO PACIENTE NO ESTUDO:

3) NÚMERO DA CEPA:

4) DATA DE COLETA DOS DADOS: ____ / ____ / ____

5) INSTITUIÇÃO:

6) DATA DE NASCIMENTO: ____ / ____ / ____

7) IDADE:

8) SEXO: 1- masculino 2- feminino

9) RAÇA: 1- branco 2- negro 3- pardo 9- ignorado

10) REGIÃO DE HABITAÇÃO: 1- urbana 2- rural 9- ignorado

11) CIDADE ONDE RESIDE: _____

12) SE BH, BAIRRO DE RESIDÊNCIA: _____

13) TIPO DE HABITAÇÃO:

1- casa/apto/barraco 2- casa de apoio/albergue/pensão 3- prisão
4- rua 9- ignorado

14) GRAU DE ESCOLARIDADE: 1- analfabeto 2- 1 grau 3- 2 grau 4- superior 9- ignorado

15) HISTÓRIA FAMILIAR OU CONTATOS DE TB: 1- sim 2- não 9- ignorado

16) SE SIM: 1- ocupacional 2- domiciliar 3- hospitalar 8- não se aplica 9- ignorado

17) COMORBIDADES ASSOCIADAS: 1- SIM 2- NÃO 9- IGNORADO

☐	alcoolismo	☐	diabetes	☐	tabagismo
☐	outras doenças infecciosas	☐	corticóide/ imunossupressor	☐	câncer
☐	outras	☐	HIV/ AIDS	☐	silicoses
				☐	
				☐	

18) COMPORTAMENTO DE RISCO: 1- SIM 2- NÃO 9- IGNORADO

☐	usuário de droga EV	☐	usuário de droga inalatória
☐	homossexual	☐	heterossexual, contato sem proteção
☐	bissexual	☐	transfusão de sangue
☐	hemofílico		

19) DOENÇA ATUAL, FORMA CLÍNICA:

01- pulmonar

02- pleural

03- linfonodal

- 04- miliar
- 05- pulmonar e pleural
- 06- pulmonar e linfonodal
- 07- linfonodal e pleural
- 08- miliar e pulmonar
- 09- miliar e pleural
- 10- miliar e linfonodal
- 11- outra
- 88- não se aplica
- 99- ignorado

20) SINTOMATOLOGIA: 1- SIM 2- NÃO 9- IGNORADO

☐	tosse		sudorese noturna		astenia
☐	hemoptise		dor torácica		emagrecimento
☐	febre	☐	dispnéia	☐	outra
		☐		☐	
		☐		☐	

21) TEMPO DE EVOLUÇÃO DA DOENÇA: meses

22) CRITÉRIO DIAGNÓSTICO: 1- SIM 2- NÃO 9- IGNORADO

☐	clínico		bacteriológico
☐	radiológico		histológico
		☐	
		☐	

23) HISTÓRIA PRÉVIA DE TB: 1- sim 2- não 9- ignorado

24) SE SIM, QUANTAS VEZES:

- 1- uma vez
- 2- duas vezes
- 3- três vezes
- 4- quatro vezes
- 5- mais de quatro vezes

8- não se aplica

9- ignorado

25) SE SIM, HÁ QUANTO TEMPO: meses

26) TRATAMENTO PRÉVIO:

1- Sim

2- Não

8- Não se aplica

9- Ignorado

27) SE SIM, NÚMERO DE TRATAMENTOS PRÉVIOS:

01- 1 tratamento 06- 6 tratamentos 88- não se aplica

02- 2 tratamentos 07- 7 tratamentos 99- ignorado

03- 3 tratamentos 08- 8 tratamentos

04- 4 tratamentos 09- 9 tratamentos

05- 5 tratamentos 10- 10 ou mais tratamentos

28) EVOLUÇÃO DO PRIMEIRO TRATAMENTO:

1- não realizado

4- abandonado

8- não se aplica

2- completo com cura

5- completo sem cura

9- ignorado

3- falência durante tratamento 6- em seguimento

29) ESPECIFICAR DROGAS USADAS NOS TRATAMENTOS ANTERIORES:

1- SIM 2- NÃO 8- NÃO SE APLICA 9- IGNORADO

☐
☐
☐
☐

isoniazida

etambutol

ciprofloxacina

terizidona

☐
☐
☐
☐

rifampicina

etionamida

ofloxacina

amicacina

☐
☐
☐
☐

pirazinamida

estreptomicina

clofazimine

outra

RESULTADO DE EXAMES:

30) IMPRESSÃO RADIOLÓGICA:

- 01- lesão cavitada unilateral
- 02- lesão cavitada bilateral
- 03- pulmão destruído unilateral
- 04- pulmão destruído bilateral
- 05- sem cavitação (consolidação)
- 06- alteração pleural
- 07- normal
- 08- outras alterações
- 09- fibroatelactasia
- 10- miliar
- 99- ignorado

EXAMES BACTERIOLÓGICOS:

31) BAAR (inclusive semiquantitativo)

32) AURAMINA

33) CULTURA CONVENCIONAL

34) CULTURA RADIOMÉTRICA

35) PCR

() POSITIVO, NÃO ESPECIFICADO

() NEGATIVO

() NÃO REALIZADO

() IGNORADO

36) IDENTIFICAÇÃO DA MICOBACTÉRIA:

- 1- *M. tuberculosis*

2- outra

8- não se aplica

9- ignorada

37) SENSIBILIDADE A DROGAS: 1- SENSIVEL 2- RESISTENTE 3- NÃO REALIZADA 8- NÃO SE APLICA 9- IGNORADA

☐ estreptomicina ☐ isoniazida ☐ rifampicina ☐ etambutol ☐ pirazinamida

38) CIM:

☐ estreptomicina ☐ isoniazida ☐ rifampicina ☐ etambutol ☐ pirazinamida

39) Genotipagem Rifampicina: mutação rpoB 1-Sim 2-Não 3- não realizada 8-não se aplica 9- ignorada

39.a) Se sim, codon 531: 1-Sim 2-Não 3- não realizada 8-não se aplica 9-ignorada

40) Genotipagem Isoniazida:

mutação katG 1-Sim 2-Não 3- não realizada 8-não se aplica 9-ignorada

mutação ahpC 1-Sim 2-Não 3- não realizada 8-não se aplica 9-ignorada

mutação inhA 1-Sim 2-Não 3- não realizada 8-não se aplica 9-ignorada

41) Genotipagem Etambutol: mutação embB 1-Sim 2-Não 3- não realizada 8-não se aplica 9-ignorada

41.a) Se sim, codon 306: 1-Sim 2-Não 3- não realizada 8-não se aplica 9-ignorada

42) Genotipagem Pirazinamida: mutação 1-Sim 2-Não 3- não realizada 8-não se aplica 9-ignorada

42.a) Se sim, codon pncA

43) SOROLOGIA HIV (ELISA): 1- POSITIVO 2- NEGATIVO 3-INDETERMINADO 9- IGNORADO

EVOLUÇÃO DO PACIENTE:

44) DIAGNÓSTICO DEFINITIVO

- 01- TB pulmonar
- 02- Neoplasia
- 03- Paracoccidiodomicose pulmonar
- 04- Silicose
- 05- Silicotuberculose
- 06- Seqüela de TB prévia
- 07- Nocardiose
- 08- não se aplica
- 09- ignorado
- 10- outro diagnóstico
- 11- SIDA
- 12- TB - MDR
- 13- outras formas de TB
- 14- sem outro diagnóstico

45) EVOLUÇÃO CLÍNICA:

- 01- melhorado com esquema 1
- 02- melhorado com esquema 1R
- 03- melhorado com esquema 3
- 04- melhora com esquema TBMDR
- 05- piora clínica com esquema 1
- 06- piora clínica com esquema 1R
- 07- piora com esquema 3
- 08- piora com esquema TBMDR
- 09- piora com esquema 1 e melhora com esquema 3
- 10- sem tratamento/abandono de tratamento
- 11- óbito

- 12- melhora sem uso de tuberculostáticos
- 13- piora com esquema 1 e melhora com esquema 1R
- 14- piora com esquema 1 e 3 e melhora com esquema TBMDR
- 15- piora com esquema 1R e melhora com esquema 3
- 16- piora com esquema 1R e 3 e melhora com esquema TBMDR
- 17- piora com esquema 1, 1R e 3 e melhora com esquema TBMDR
- 18- piora com esquema 3 e melhora com esquema TBMDR
- 19- piora com esquema 1 e 3 e abandono
- 20- piora com esquema 1 e 3 e óbito
- 21- piora com esquema 1 e melhora com esquema TBMDR e óbito
- 22-abandono e óbito
- 88- não se aplica
- 99- ignorado

ANEXOS

10 ANEXOS

10.1 ANEXO A – Identificação da micobactéria (método NAP)

Princípio: O NAP (p-nitro-alfa-acetilamino-B-hidroxipropiofenona) foi utilizado na diferenciação do complexo *M. tuberculosis* de outras micobactérias do gênero, por método radiométrico. Baseia-se na adição do NAP ao meio de cultivo 7H-12B e verificação do crescimento da micobactéria através da radiometria.

Procedimento:

Análise microscópica do isolado teste em meio líquido, para certificação da presença da micobactéria. Considerar índice de crescimento (growth index-GI) superior a 30;

Inoculação em ágar sangue para verificação da pureza do cultivo;

Homogeneização da cultura após avaliação e transferência de 1 mL da cultura para o frasco NAP;

O frasco mãe (original) é mantido como controle. Caso o GI for >100, a amostra deverá ser diluída;

Incubação dos frascos a 37°C;

Realização de leitura diária por 2 a 6 dias.

Interpretação: O teste é considerado negativo, ou seja *M. tuberculosis*, quando ocorrer decréscimo consecutivo nos valores de GI ou ausência de crescimento.

O processo descrito está de acordo com o manual de instruções do fabricante: *Product and Procedure Manual, MA-0029 Rev E., Becton-Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD, May 1996*



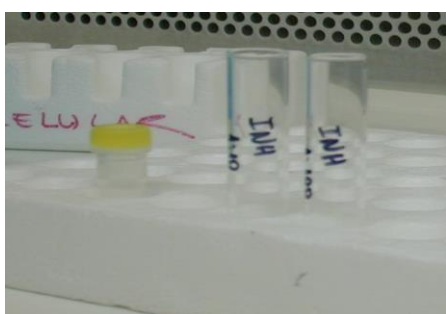
Coleta de raspado de colônia



Homogeneização pelo vórtex



Meio para cultivo radiométrico



Cultivo radiométrico - diluição de isoniazida

10.2 ANEXO B - Cultura radiométrica e TS qualitativo pelo sistema BACTEC460

Princípio: Baseia-se no crescimento de micobactérias em meio líquido contendo dióxido de carbono (CO₂). A razão de crescimento é medida pela detecção do CO₂ marcado liberado pelas micobactérias. Pode ser utilizado para determinação da CIM quando se incorpora droga ao meio.

Procedimento:

Isolamento das colônias de micobactéria em meio sólido Loweinstein-Jensen;
Inoculação de colônias de *M. tuberculosis* nos frascos contendo meio 7H-9 Tween, seguida de homogeneização com seringa de tuberculina. Deve-se manter amostras em repouso até alcançar escala de Mac Farland;
Adição de cultura em meio de cultivo radiométrico BACTEC 12B, após obtenção de índice de crescimento (*growth index* - GI) entre 500 e 800;
Após o crescimento, homogeneização da cultura com seringa de 1 mL;
Retirada de 0,1 mL da solução para diluição em um tubo de hemólise contendo 900 µL de água destilada estéril;
Transferência de 0,1 mL dessa suspensão para um segundo tubo, contendo 900 µL de água destilada para obtenção de solução de inóculo em diluição de 100 X (suspensão microbiológica);
Injeção de 0,1 mL da suspensão diluída (1:100) em um frasco de meio de cultura BACTEC 12 B (controle sem drogas); e nos frascos contendo os antibióticos isoniazida (0,1 µg/mL), rifampicina (0,2 µg/mL), pirazinamida (100 µg/mL), estreptomicina (2,0 µg/mL) e etambutol (2,5 µg/mL).
Incubação em estufa a 37°C;
Realização de leitura radiométrica diária e no mesmo horário, até um dia após o GI do frasco controle exceder 30;
Determinação do índice de crescimento bacteriano (CO₂ radioativo eliminado pela bactéria);

Definição da sensibilidade ou resistência às drogas de acordo com os critérios estabelecidos pelo fabricante (Becton Dickinson Diagnostic System, Maryland – Estados Unidos da América), com base nas variações do GI dos frascos controle e com drogas.

Interpretação: nos casos em que diferença no frasco do controle for menor que a diferença obtida nos frascos que contêm a droga, tem-se resistência.

10.3 ANEXO C - TS quantitativo: determinação da CIM pelo sistema BACTEC460

Procedimento

Diluição das drogas e acréscimo aos meio BACTEC 12B, de maneira a se obter as concentrações referentes aos padrões sugeridos por HEIFETS (1988);

Inoculação de volume correspondente a 0,1 mL das culturas obtidas no meio BACTEC 12B diretamente nos frascos de meio de cultivo BACTEC contendo concentrações crescentes das diferentes drogas;

Injeção de um volume de 0,1 mL das mesmas culturas, após diluição prévia, na razão 1:10 em um frasco de BACTEC, sem a presença de drogas (frasco controle);

Incubação de frascos em estufa a 37°C;

Realização de leitura diária em aparelho BACTEC 460;

Estabelecimento da CIM a partir da não detecção do aumento do índice de crescimento em pelo menos 3 dias consecutivos, tomando-se como base o frasco com menor concentração da droga e o aumento proporcional no frasco controle.

Interpretação: A definição da CIM é tida como a menor concentração da droga capaz de inibir 99% da população bacteriana, conforme condições metodológicas estabelecidas por HEIFETS (1988).

10.4 ANEXO D - Prova da atividade da pirazinamidase (PZase)

Fundamento: As cepas de *M. tuberculosis* que são sensíveis à pirazinamida (Z) possuem a enzima pirazinamidase (PZase) que metaboliza a Z em ácido pirazinóico; as cepas resistentes perdem atividade da PZase. Nesta técnica, cepas sem atividade de PZase não metabolizam o ácido pirazinóico e sua presença é detectada pela formação de um anel de cor rosa, conforme o método de WAYNE (WAYNE, KUBICA, 1986).

Procedimento:

Preparação do meio com 6,5 g de caldo desidratado, 0,1 g de pirazinamida, 2,0 g de piruvato de sódio, 15,0 g de ágar e 1.000 mL de água destilada;

Fundição do ágar e distribuição de 5 mL em cada tubo; ainda quente.

Retirada da massa bacilar (5-10 mg) proveniente de um cultivo jovem em meio de Lowenstein-Jensen com uma alça descartável;

Inoculação sobre a superfície do meio e incubação por 37° C, durante 6-7 dias;

Após a incubação, introduziu-se em cada tubo 1 mL da solução de sulfato ferroso amoniacal a 1% e colocou-se na geladeira;

Após 3 horas, o surgimento de um anel rosado de difusão de sal ferroso foi considerado como indicativo de hidrólise da Z com formação de ácido pirazinóico.

Interpretação: Controle positivo: *M. tuberculosis*, H37 Rv; **Controle negativo:** *M. bovis*, BCG

10.5 ANEXO E - Análises moleculares

E.1 Extração do DNA cromossomal

E.1.1 Técnica de Soolingen:

Isolamento do DNA cromossomal, conforme descrito por van SOOLINGEN *et al.* (1994), pela técnica de CTAB (protocolo referenciado em RFLP. National Institute of Public Health and Environmental Protection. Bilthoven, The Netherlands, 1994)

Ressuspensão de algumas colônias em TE (This EDTA) e aquecimento a 80°C por 20 minutos para inativação;

Adição de lisozima para digestão da parede da micobactéria em uma concentração final de 1 mg/mL e incubação do tubo 1 h/37°C;

Adição de 70 µL de SDS 10% (sódio dodesil sulfato) e 5 µL de proteinase K (10 mg/mL) e incubação da mistura por 10 minutos a 65°C;

Adição de um volume de 100 µL de NaCl 5 M e 100 µL de CTAB à mistura, o qual foi agitado e incubado por 10 minutos a 65°C;

Acréscimo de igual volume de clorofórmio álcool isoamílico à mistura, agitado por 10 segundos;

Após a centrifugação por 5 minutos/12.000 rpm, transferência da fase aquosa para outro tubo;

Adição à fase aquosa de 0,6 vol. de isopropanol para precipitação do DNA.

Resfriamento da solução por 30 min a 20°C negativos e centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm, seguido de lavagem de precipitado com etanol 70%;

Secagem do precipitado à temperatura ambiente e dissolução em TE (20 mL) ou água ultrapura.

E.1.2 Técnica de van Embden

Suspensão de algumas colônias de *M. tuberculosis* em tubo de Eppendorf contendo 500 µL de TE 1 x (10 mM Tris-base, 1mM EDTA, pH 8,0), a partir da cultura em meio de LJ;

Aquecimento das amostras em banho-maria a 80°C por 20 minutos para inativação das células;

Realização de quebra da parede celular com 50 µL de lisozima (10 mg/mL);

Incubação do tubo a 37°C "overnight";

Adição, após, de 5µL de proteinase K (concentração de 10mg/mL) e 70µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%;

Incubação dos tubos em banho-maria a 65°C durante 10 minutos;

Adição, em seguida, de 100 µL de NaCl 5M e 100µL de uma mistura CTAB/NaCl (Hexadecyl Trimetyl Amonium Bromide) para complexação das proteínas e lipídeos;

Reaquecimento dos tubos em banho-maria a 65°C por 10 minutos.

Após este período, as amostras são retiradas do banho-maria, e acrescidas de 750µL de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1;

Centrifugação das amostras por 15 minutos a 12000rpm, para a separação das fases.

Após centrifugação, transferida a fase aquosa para um tubo de microcentrífuga limpo e complementado com 450µL de isopropanol, seguido de resfriamento a - 20°C por 30 minutos e posteriormente nova centrifugação a 12000 rpm por 20 minutos;

Lavagem dos sedimentos com etanol a 70% por centrifugação e deixados à temperatura ambiente até completa secagem;

Dissolução das amostras de DNA extraídas em 25µL de tampão TE;

Diluição de 2µl dos DNAs extraídos 200µl de tampão TE 1X;

Quantificação do DNA extraído em espectrofotômetro Gene Quant (Pharmacia Biotech) através de uma medida de absorbância de 260nm.

E.2 RFLP

Eletroforese em gel de agarose

Obtenção do DNA pela técnica de CTAB (van Soolingen, 2001), seguido da digestão de aproximadamente 4,5 µg de DNA com 10 unidades da enzima de restrição *Pvu* II (Promega);

Realização da reação enzimática em tubo eppendorff estéril, calculando-se o volume total da reação para 20 µl, seguido de incubação a 37°C por 1 hora;
 Aplicação das amostras de DNA digeridos nos orifícios de um gel de agarose 0,8% medindo de 20x25 cm;
 Submissão a uma corrente inicial de 100 volts por 10 minutos, seguido de uma corrente de 25 volts durante um período de 16 a 18 horas à temperatura ambiente;
 Fotografia do gel preparado com brometo de etídio por 10 minutos.

Southern blot e hibridação

Transferência dos DNAs digeridos presentes no gel de agarose para uma membrana de nylon (Hybond TM N+ Amersham Life Science Inglaterra) utilizando-se um equipamento Vacu-gene XL (Pharmacia) e empregando-se os reagentes e tempos recomendados pelo fabricante. Este procedimento foi constituído das seguintes etapas:

- a) depuração com solução de HCl 0,25M por 7 minutos;
- b) desnaturação com solução NaCl 1,5M, e NaOH 0,5M por minutos
- c) neutralização com Tris 1,0M e NaCl 1,5M (pH 7,5) por mais 15 minutos
- d) transferência com solução SSC 20x (NaCl 3,0M, Na₃ citrato 0,3M, pH 7,0) por 30 minutos.
- e) fixação dos fragmentos de DNA à membrana em forno a 80°C durante 2 horas.

Construção da sonda:

Geração da sonda utilizada para hibridação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se os seguintes oligonucleotídeos (um par)

INS1-5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC

INS2-5' GCG TAG GCG TCG CTG ACA AA

Amplificação dos oligonucleotídeos numa região de 245 pares de base do elemento de inserção 6110, presente nas cepas do complexo *M. tuberculosis*;

Extração do DNA molde utilizado na PCR pela técnica de CTAB (descrita anteriormente) de uma cepa de *M. tuberculosis* H37Rv;

Realização de 10 reações da PCR utilizando-se reagentes, da marca Pharmacia, nas seguintes concentrações: tampão para PCR 1x concentrado (Tris-HCl 10mM,

pH 8,3, cloreto de potássio 50 mM, cloreto de magnésio 15 mM, gelatina 0,1%), Cloreto de magnésio 10 mM, Deoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP 200 mM de cada um). Taq polimerase 1,5 unidades (U) e água Milli Q estéril qsp 45µL.

Colocação de 5µL de DNA em tubo estéril, após adição dos 45 µL da mistura de reação.

A mistura foi levada a um termociclador Gene Amp 9600 (Perkin Elmer) e submetida por 10 minutos a 94°C para desnaturação e a 30 ciclos de amplificação, a saber: 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 56°C e 1 minuto a 72°C.

Deteção do produto amplificado realizada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado e visualizado, como descrito anteriormente.

Realização da quantificação do produto amplificado em espectrofotômetro Gen quant (Pharmacia) diluindo-se 2 µL da amostra em 200 µL de água destilada estéril;

Realização da leitura em comprimento de onda de 260 nm.

Hibridização e detecção:

Hibridização da membrana contendo os fragmentos de DNA com 600 ng sonda específica em forno giratório (Hybaid Instruments, Holbrook, NY) a 42° C, por um período de 16-18 horas.

Obtenção da sonda através da amplificação pela PCR de um fragmento de 245 pb, situado à direita do sítio de clivagem da enzima *Pvu* II, presente no IS6110, utilizando os seguintes *primers*:

INS-1	5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC	HERMANS <i>et al.</i>, 1990
INS-2	5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA	HERMANS <i>et al.</i>, 1990

Amplificação do DNA pela PCR realizada em um termociclador (Mini Cycler - MJ Reasearch) sob as seguintes condições: 30 ciclos de 2 min a 94° C, 2 min a 68° C, e 2 min a 72° C;

Purificação do fragmento amplificado com colunas MicroSpin™ S-300 (Pharmacia Biotech) e marcação enzimática utilizando-se o kit ECL™ (Amersham);

Marcação direta da sonda de DNA com a enzima peroxidase de raiz-forte (HRP-*Horseradish Peroxidase*);

Desnaturação completa da sonda, de forma que o DNA fique simples fita e, portanto, carregado negativamente.

Adição da HRP complexada com um polímero carregado positivamente e ligada com o DNA por atração de cargas;

Adição do glutaraldeído causa a formação de ligações químicas de modo que a sonda é covalentemente marcada com a enzima;

Utilização da sonda marcada na hibridização com o DNA-alvo imobilizado na membrana;

Realização da detecção pela sensibilização de um filme autoradiográfico através de uma reação de quimiluminescência;

Catalização da oxidação do substrato luminol pela HRP, o qual, na presença de um estimulador (*enhancer*) químico, resulta em uma grande emissão de luz, que é prontamente detectada em um filme autoradiográfico.

Interpretação: Análise dos padrões de bandas geradas pelo método de RFLP:

Realização da análise comparativa dos padrões eletroforéticos e caracterização do perfil genético pelo programa de computador Gel Compar versão 4.2 (Applied Maths Bélgica), seguindo recomendações de TENOVER *et al.* (1997).

E.3 – RFLP

E.3.1 Extração do DNA e digestão por enzima de restrição:

Tipificação e extração dos DNA's isolados de *M. tuberculosis* foram (caracterizados genotipicamente) pelo método padronizado por van EMBDEN *et al.* (1993);

Digestão do DNA cromossomal isolado da cada amostra pela enzima de restrição *Pvu* II, conforme descrito pelo autor (van EMBDEN *et al.*, 1993.);

Separação dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose 0,8% a 35v (volts).

E.3.2 Transferência para a membrana:

Transferência dos fragmentos de DNA transferidos para membrana de náilon após corrida eletroforética, utilizando-se equipamento de transferência a vácuo, conforme instruções do fabricante;

Fixação dos fragmentos de DNA à membrana em forno a 80°C por 2h.

Pré-hibridização por 1 h em forno giratório a 42°C (Hybaid -Holbrook NY ®).

E. 3.3 Sonda e marcação – hibridização:

Obtenção da sonda utilizada corresponde ao fragmento de 245 pares de bases do IS6110 por PCR, usando DNA molde, com cepa de referência 14323.

Utilização de método não radioativo para marcação (Sistema ECL - Amersham pharmacia “enhanced chemiluminescence”) acoplado à peroxidase.

E.3.4 Análise:

O *Southern blot* foi realizado para determinar o número e tamanho de fragmentos de DNA cromossomal que hibridizam com o elemento de inserção IS6110. Os padrões de RFLP foram comparados pelo Software Gel Compar:

- isolados idênticos são considerados do mesmo cluster;
- não concordantes (uma ou duas bandas) são considerados da mesma família;
- padrões de RFLP distintos não são considerados clusters.

10.6 ANEXO F - Análise genômica para detecção de mutações por sequenciamento

Drogas e mutações testadas: Isoniazida (*katG*; *ahpC* e *inhA*), Pirazinamida (*pncA*), Etambutol (*embB*).

PCR - Reação em cadeia de polimerase e sequenciamento

Primers: Sequências específicas de DNA (*primers*) foram baseadas em regiões dos genes estudados (*katG*, *inhA*, *ahpC*, *pncA* e *embB*) do genoma de *M. tuberculosis* (acesso no GenBank AL123456) associados com a resistência à H, Ze E.

Utilização de *primers* descritos nos estudos de SILVA *et al.* (2003) e RODRIGUES (2005) para amplificação da região promotora dos genes, desenvolvidos no CDCT (Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) da FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde), do Rio Grande do Sul.

Reação de PCR: A reação de PCR, para a obtenção dos produtos destinados às análises moleculares, foi realizada em um termociclador (MiniCyclerTM – Hot Bonnet PTC – 150 / MJ Research). A amplificação dos fragmentos foi padronizada em 2 min a 94°C, 1 min a 55°C e 2 min a 72°C durante 30 ciclos.

Detecção dos produtos amplificados por PCR:

Submissão dos produtos da amplificação da reação de PCR à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, e detectados em um transluminador de UV.

Utilização de marcador de peso molecular durante as corridas eletroforéticas de 100 pb DNA Ladder (Gibco-BRL®).

Sequenciamento automático:

Análise da região dos genes e das regiões regulatórias dos genes envolvidos com a resistência às drogas anti-TB, por sequenciamento automático, usando-se diretamente o produto de PCR;

Realização das reações de sequenciamento com o kit *Taq Dye Deoxy terminator cycle sequencing kit* (Applied Biosystems Inc.) utilizando-se o produto amplificado e *primer* para cada gene estudado.

CTAB - Brometo de Cetiltrimetiamônio

SDS - Dodecilsulfato de sódio

TRIS - Trishidroximetil

10.7 ANEXO G - Análise genômica para detecção de mutação por PCR

reverse line blot hybridization

Droga e mutação testadas: Rifampicina e gene *rpoB*

Fundamento da técnica: Amplificação da região de mutação do *rpoB* por PCR, utilizando-se um primer biotinilado. Esse produto do PCR (fragmento do DNA marcado por biotina) é hibridizado com oligo's (sequências de DNA) de cepas selvagens e mutantes que estão covalentemente ligados à membrana através do "reverse line blotting". A detecção da hibridização positiva é evidenciada em radiografia, após incubação com estreptavidina-peroxidase e revelação por quimiluminescência. Nesse caso, cepas sensíveis à rifampicina hibridizam apenas com oligo's selvagens, enquanto cepas mutadas hibridizam com oligo's mutantes.

Reação de PCR:

Preparação de solução mix de trabalho contendo água (34,9 µL), primers *forward* e *reverse* (10 picomol/ µL), tampão (10x), dNTPs (0,2 MM), cloreto de magnésio (1,5 MM) e taq polimerase (0,4 µL) para volume final de 50 µL/ tubo, contemplando 22 reações;

Adição ao mix 5,0 µL do DNA de cada amostra, extraído previamente por choque térmico;

Colocação dos microtubos Eppendorf® contendo mix e amostras na máquina de PCR (Programmable Thermal Controller) para 35 ciclos de amplificação, conforme protocolo.

Hibridização:

Geração de fragmentos de DNA de mais ou menos 450 pb (fragmentos de DNA) referente à região determinante de resistência à R, marcados com biotina;

Após a amplificação, separação da dupla fita de DNA através da denaturação;

Os tubos Eppendorf ® são mantidos no gelo para impedir o re-anelamento das fitas do DNA;

Colocação de membrana de náilon biodyneC® no minibloter e aplicação das amostras nas canaletas;

Hibridização no forno a 50°C por uma hora;

Realização de duas lavagens sucessivas com 200 mL de SSPE 2 x e SDS a 0,5%;

Retirada da membrana já hibridizada e colocação na garrafa com tampão (10 mL) mais estreptoavidina-peroxidase para ligação da biotina com a estreptoavidina-peroxidase;

Lavagem da membrana por duas vezes por cinco minutos para retirada de resíduos.

Revelação:

Preparação da membrana para revelação, utilizando-se reagente de detecção da Pharmacia ECL (contendo peróxido de hidrogênio e luminol);

Incubação em câmara escura por 1 hora e 30 minutos.

	Concentração	Uma reação
Taq pol	5 U/ μ L	0,2 μ L (1 u)
Tampão (buffer)	10 x	5,0 μ L (1x)
dNTPs	25 MM	0,4 μ L (0,2)
Primer TR 10A	10 picomol/ μ L	2,0 μ L (20 picomol)
Primer TR 11A L	10 picomol/ μ	1,5 μ L (12 MM)
MgCl ₂	50 MM	34,9 μ L
H ₂ O qsp	50 μ L	5,0 μ L
DNA		46 μ L/ tubo