

Alan Douglas Gonçalves

**CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE FÁRMACOS DE
PRIMEIRA E SEGUNDA LINHA DO *Mycobacterium tuberculosis*
MULTIRRESISTENTE E MUTAÇÕES RELACIONADAS À
ISONIAZIDA E RIFAMPICINA EM LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA
DE MINAS GERAIS, BRASIL**

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical
Belo Horizonte - MG
2014

Alan Douglas Gonçalves

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE FÁRMACOS DE PRIMEIRA E
SEGUNDA LINHA DO *Mycobacterium tuberculosis* MULTIRRESISTENTE E
MUTAÇÕES RELACIONADAS À ISONIAZIDA E RIFAMPICINA EM LABORATÓRIO
DE REFERÊNCIA DE MINAS GERAIS, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Silvana Spíndola de Miranda

Belo Horizonte - MG
2014

Gonçalves, Alan Douglas.

G635c Concentração inibitória mínima de fármacos de primeira e segunda linha do *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente e mutações relacionadas à isoniazida e rifampicina em laboratório de referência de Minas Gerais, Brasil [manuscrito]. / Alan Douglas Gonçalves. - - Belo Horizonte: 2014.

98f.: il.

Orientador: Silvana Spindola de Miranda.

Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Tuberculose Resistente à Múltiplos Medicamentos. 2. *Mycobacterium tuberculosis*. 3. Testes de Sensibilidade Microbiana. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Miranda, Silvana Spindola de. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WF 200

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora

Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-Reitora de Pesquisa

Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor

Tarcizo Afonso Nunes

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECTOLOGIA E MEDICINA

TROPICAL

Coordenador

Manoel Otávio da Costa Rocha

Sub-Coordenador

Antônio Luiz Pinheiro

Colegiado

Manoel Otávio da Costa Rocha

Vandack Alencar Nobre Jr.

Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Denise Utsch Gonçalves

Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Mariângela Carneiro

Paula Souza Lage Carvalho

Aos meus pais, pelos ensinamentos da vida e por saberem educar seus filhos. Amo vocês!!!

Aos meus irmãos, cunhado e cunhadas, e minhas sobrinhas Gabi e Helena pelo apoio constante apesar da distância.

À Kat pelo carinho, dedicação e apoio neste período de muito estudo e pouco tempo.

Aos amigos e familiares pela força e companheirismo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, sabedoria e orientação em todos os momentos.

À professora Silvana Spíndola de Miranda, pela oportunidade, orientação neste estudo, confiança e ensinamentos.

À direção do Instituto Octávio Magalhães (LACEN-MG) da Fundação Ezequiel Dias e ao Chequer Buffe Chamone, coordenador da Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças da FUNED pelo apoio e oportunidade.

À Marluce A. Assunção Oliveira, chefe do Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas, pela oportunidade e confiança na realização deste estudo.

Ao Cláudio José Augusto, responsável pelo Laboratório de Micobactérias do SDBF, pelos ensinamentos, apoio e incentivo na realização deste estudo.

À equipe do Laboratório de Micobactérias do SDBF, em especial, Elza e Glaydson, pelo companheirismo e apoio.

Aos colegas e estagiários do SDBF que auxiliaram em momentos oportunos.

À professora Wânia da Silva Carvalho e ao Grupo de Estudos em Micobacterioses da UFMG, pela oportunidade de aprendizado, sugestões e experiências compartilhadas, geralmente às quartas-feiras...

À Carla Coimbra Figueiredo, Lida Jouca de Assis Figueredo, Jamilly dos Reis Figueiredo e Isabela Neves de Almeida, do Laboratório de Pesquisa em Micobactérias da Faculdade de Medicina da UFMG pela realização do ensaio de detecção de mutações por meio da fita Genotype MTBDRplus®.

À coordenação, professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina/UFMG pelo aprendizado.

Aos colegas das disciplinas cursadas, em especial Adebai e Nathália.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) através do Programa de Capacitação de Recursos Humanos do Estado de Minas Gerais (PCRH) pelo apoio financeiro a este projeto.

“... nossas concepções da realidade jamais apresentam outra coisa a não ser soluções momentâneas. Por conseguinte devemos estar sempre prontos a transformar estas ideias, ... , se, lucidamente, queremos ver da maneira mais perfeita possível os fatos perceptíveis que mudam.”

Albert Einstein

RESUMO

A tuberculose é uma doença de importância global e representa um sério problema de saúde pública envolvendo aspectos sociais e econômicos para o Brasil e o mundo. A emergência da resistência aos fármacos em *Mycobacterium tuberculosis* é uma preocupação crescente e o aumento da incidência de tuberculose multirresistente e extensivamente resistente dificulta o tratamento e controle da doença. A simples separação de isolados clínicos de *M. tuberculosis* como “resistentes” com base em teste de sensibilidade à "concentração crítica" precisa ser completada por testes de medidas quantitativas para demonstrar a existência de diferentes níveis de resistência, no intuito de melhor avaliar os fármacos disponíveis para a condução de um tratamento apropriado em tuberculose multirresistente e extensivamente resistente. A concentração inibitória mínima representa a menor concentração que inibe o crescimento bacteriano, sendo uma medida quantitativa da resistência aos fármacos. O estudo de mutações nos genes que conferem resistência aos fármacos tem sido descrito como relevante nas avaliações dos níveis de resistência. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a concentração inibitória mínima dos fármacos de primeira e segunda linha e mutações relacionadas à isoniazida e rifampicina de isolados clínicos de *M. tuberculosis* multirresistente em laboratório de referência do estado de Minas Gerais. Um total de 115 cepas de *M. tuberculosis* multirresistente correspondente a 97 pacientes foi analisado no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias, entre 2008 e 2011. A concentração inibitória mínima foi determinada por meio do método automatizado BACTEC® MGIT® 960. Os fármacos testados e suas respectivas faixas de concentração foram: isoniazida (0,007 a 32 µg/mL), rifampicina (0,007 a 64 µg/mL), estreptomicina (0,06 a 64 µg/mL), etambutol (0,12 a 64 µg/mL), amicacina (0,06 a 32 µg/mL), levofloxacino (0,03 a 64 µg/mL), rifabutina (0,007 a 16 µg/mL) e cicloserina (0,25 a 128 µg/mL). Também foi realizada a detecção molecular de mutações nas regiões *rpoB*, *katG* e *inhA* por meio do ensaio Genotype MTBDRplus®. Das cepas de *M. tuberculosis* multirresistente do referido período que atenderam os critérios de inclusão, 42 foram avaliadas para a concentração inibitória mínima (MIC), sendo três dessas, extensivamente resistente. Já para a detecção molecular de mutações foram avaliadas 40 cepas. Quarenta por cento (40%) das cepas apresentaram baixo nível de resistência para isoniazida, 13,5% para rifampicina, 31,2% para estreptomicina, 33,3% para etambutol e levofloxacino e 38,9% para rifabutina. Em relação à cicloserina, todas as cepas apresentaram MIC <32 µg/mL e 100% (n=2) das cepas multirresistente resistentes à amicacina apresentaram alto nível de resistência. Em relação às mutações em *rpoB* e os níveis

de resistência à rifampicina, a mutação D516V foi associada à baixo nível de resistência à rifampicina. Essa mutação também estava associada à cepas sensíveis à rifabutina. A mutação S531L em *rpoB* foi associada à baixo nível de resistência à rifabutina enquanto que a mutação H526Y foi associada à alto nível. Em relação às mutações em *katG* e *inhA*, a mutação S315T *katG* foi associada à moderado nível de resistência à isoniazida, enquanto que mutações simultâneas S315T *katG* e C15T *inhA* foram associadas à alto nível. O conhecimento dos níveis de resistência aos fármacos de primeira e segunda linha de *M. tuberculosis* mutirresistente e extensivamente resistente e a detecção das mutações relacionadas podem fornecer subsídios importantes para auxiliar na condução do tratamento para esses pacientes.

PALAVRAS CHAVE: Resistência a multimedamentos. Diagnóstico. Testes de sensibilidade microbiana.

ABSTRACT

Tuberculosis is a disease of global importance and represents a serious public health problem involving social and economic aspects for Brazil and the world. The emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is a growing concern and increased incidence of multidrug-resistant and extensively drug-resistant TB complicates treatment and disease control. The simple separation of clinical isolates of *M. tuberculosis* as "resistant" based on sensitivity testing the "critical concentration" must be supplemented by quantitative measures tests to demonstrate the existence of different levels of resistance, in order to better assess drugs available to conduct a proper treatment in multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. The minimal inhibitory concentration is the lowest concentration that inhibits bacterial growth, a quantitative measure of drug resistance. The study of mutations in genes which confer resistance to drugs have been described as important in the evaluations of resistance levels. Thus, this study aimed to evaluate the minimal inhibitory concentration of the first and second line drugs and mutations related to isoniazid and rifampicin of clinical isolates of multidrug-resistant *M. tuberculosis* in reference laboratory of the state of Minas Gerais. A total of 115 strains of multidrug-resistant *M. tuberculosis* corresponding to 97 patients were analyzed at the Central Public Health Laboratory of the State of Minas Gerais, Ezequiel Dias Foundation, between 2008 and 2011. The minimal inhibitory concentration was determined by the automated method BACTEC[®] MGIT[®] 960. The drugs tested and their concentration ranges are: isoniazid (0.007 to 32 µg/mL), rifampicin (0.007 to 64 µg/mL), streptomycin (0.06 to 64 µg/mL), ethambutol (0.12 to 64 µg/mL), amikacin (0.06 to 32 µg/mL), levofloxacin (0.03 to 64 µg/mL), rifabutin (0.007 to 16 µg/mL) and cycloserine (0.25 to 128 µg/mL). We also promoted the molecular detection of mutations in *rpoB* regions, *katG* and *inhA* through Genotype MTBDRplus[®] test. Of multidrug-resistant strains of *M. tuberculosis* that period who met the inclusion criteria, 42 were evaluated for the minimal inhibitory concentration (MIC), three of these, extensively drug-resistant. As for the molecular detection of mutations were 40 strains evaluated. Forty percent (40%) of the strains showed low level resistance to isoniazid, 13.5% to rifampicin, 31.2% to streptomycin, 33.3% for ethambutol and levofloxacin and 38.9% for rifabutin. Regarding cycloserine, all strains showed MIC <32 mg / mL and 100% (n = 2) of multirresistente strains resistant to amikacin showed a high level of resistance. Concerning the mutations in the *rpoB* and rifampicin resistance levels, the D516V mutation was associated with low level resistance to rifampicin. This mutation was also associated with strains sensitive to rifabutin. The S531L mutation in

rpoB was associated with low levels of rifabutin resistance while the H526Y mutation was associated with high level. With respect to mutations in *katG* and *inhA*, *katG* S315T mutation was associated with a moderate level of resistance to isoniazid, while simultaneous mutations S315T *katG* and C15T *inhA* were associated with high level. Knowledge of resistance levels to drugs of first and second line of *M. tuberculosis* and extensively drug-resistant mutirresistente and detection of related mutations may provide important information to assist in conducting the treatment for these patients.

KEY WORDS: XDR-TB. Diagnostic. Microbial sensitivity tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa mundial das taxas de incidência de TB por 100 mil habitantes, 2013.	19
Figura 2 - Número absoluto de casos de TB MDR notificados, 2013.	22
Figura 3 - Incidência de casos de TB MDR notificados por 100 mil habitantes, 2013.	22
Figura 4 - Número de pacientes com TB XDR confirmado laboratorialmente que iniciaram tratamento em 2013.	23
Artigo	
FIGURA 1 Diagrama de pontos de MIC de fármacos de primeira e segunda linha de <i>M. tuberculosis</i> MDR/XDR e sensíveis.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de grupos de fármacos utilizados no tratamento da TB.	25
Tabela 2 - Concentração crítica de fármacos para teste de sensibilidade pelo método das proporções em LJ e BACTEC® MGIT® 960.	34
Tabela 3 - Fármacos utilizados com seus respectivos solventes.	37
Tabela 4 - Concentrações dos fármacos testados para MIC em BACTEC® MGIT® 960 de <i>M. tuberculosis</i> sensíveis.	38
Tabela 5 - Concentrações dos fármacos testados para MIC em BACTEC® MGIT® 960 de <i>M. tuberculosis</i> resistentes.	38
Tabela 6 - Pontos de corte de resistência para MIC de fármacos de primeira e segunda linha em BACTEC® MGIT® 960 de <i>M. tuberculosis</i>	40
 Artigo	
TABELA 1 MIC de <i>M. tuberculosis</i> MDR/XDR (µg/mL).	51
TABELA 2 MIC de <i>M. tuberculosis</i> sensíveis (µg/mL).	53
TABELA 3 Níveis de resistência de <i>M. tuberculosis</i> MDR/XDR.	53
TABELA 4 Mutações na região <i>rpoB</i> relacionadas aos níveis de resistência à RIF.	54
TABELA 5 Mutações na região <i>katG/inhA</i> relacionadas aos níveis de resistência à INH	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMK	Amicacina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C15T	Substituição de base nitrogenada citosina por timina na posição -15
CC	Controle de crescimento bacteriano
CIC	Cicloserina
CRPHF	Centro de Referência Professor Hélio Fraga
D516V	Substituição do aminoácido aspartato por valina no códon 516
EMB	Etambutol
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
H526D	Substituição do aminoácido histidina por aspartato no códon 526
H526Y	Substituição do aminoácido histidina por tirosina no códon 526
H ₂ O	Água
HIV	Vírus da imunodeficiência humana adquirida
INH	Isoniazida
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LVX	Levofloxacino
LJ	Löwenstein Jensen
M	Molar
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR	Multirresistente aos fármacos
µg	micrograma
MG	Minas Gerais
MGIT	<i>Mycobacterial Growth Indicator Tube</i>
MIC	Concentração inibitória mínima, do inglês <i>minimal inhibitory concentration</i>
MODS	<i>Microscopic observation drug susceptibility assay</i>
MTT	<i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
mL	Mililitro
N	Normal
NaOH	Hidróxido de sódio

OFX	Ofloxacino
OMS	Organização Mundial da Saúde
R	Resistente
REMA	<i>Resazurin microtiter assay plate</i>
RFB	Rifabutina
RIF	Rifampicina
S315T	Substituição do aminoácido serina por treonina no códon 315
S531L	Substituição do aminoácido serina por leucina no códon 531
S	Sensível
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
STR	Estreptomicina
TB	Tuberculose
TS	Teste de sensibilidade
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WHO	<i>World Health Organization</i>
XDR	Extensivamente resistente aos fármacos

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\text{\textcircled{R}}$	Marca registrada
$\%$	Porcentagem
ρ	Letra grega <i>rho</i>
$<$	Menor
$>$	Maior
\leq	Menor ou igual
\geq	Maior ou igual

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	17
1.1 Introdução	18
1.1.1 A tuberculose	18
1.1.2 A tuberculose no Brasil e em Minas Gerais	19
1.1.3 Tuberculose resistente aos fármacos no mundo	21
1.1.4 Tuberculose resistente aos fármacos no Brasil e em Minas Gerais	23
1.1.5 Tratamento	24
1.1.6 Heterogeneidade da resistência bacteriana	26
1.1.7 Sistema automatizado BACTEC® MGIT® 960	27
1.1.8 Mutações e Genotype MTBDRplus®	29
1.2 Justificativa	30
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3 METODOLOGIA DETALHADA	33
3.1 Aspectos éticos	33
3.2 Delineamento do estudo	33
3.3 Tamanho amostral	35
3.3.1 Critério de inclusão	36
3.3.2 Critérios de exclusão	36
3.4. Viabilidade das cepas bacterianas	36
3.5. Fármacos	37
3.6 Concentração inibitória mínima pelo método BACTEC®MGIT® 960	39
3.7 Genotype MTBDRplus®	41
3.8 Análises estatísticas	41
4 ARTIGO	43
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67

6 PERSPECTIVAS	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS	78
ANEXO A – Folha de Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa	78
ANEXO B – Ata da defesa de dissertação de mestrado	79
ANEXO C – Folha de aprovação	80
ANEXO D – Normas de publicação da revista <i>Journal of Clinical Microbiology</i>	81
APÊNDICES	82
APÊNDICE A – Padrão de sensibilidade à concentração crítica de fármacos de primeira e segunda linha de <i>M. tuberculosis</i> MDR/XDR	82
APÊNDICE B – Concentração inibitória mínima de isoniazida	83
APÊNDICE C – Concentração inibitória mínima de rifampicina	84
APÊNDICE D – Concentração inibitória mínima de estreptomicina	85
APÊNDICE E – Concentração inibitória mínima de etambutol	86
APÊNDICE F – Concentração inibitória mínima de amicacina	87
APÊNDICE G – Concentração inibitória mínima de levofloxacino	88
APÊNDICE H – Concentração inibitória mínima de cicloserina	89
APÊNDICE I – Concentração inibitória mínima de rifabutina	90
APÊNDICE J – Concentração inibitória mínima de cepas de <i>M. tuberculosis</i> sensíveis	91
APÊNDICE K – Correlação de MIC de RIF e RFB de <i>M. tuberculosis</i> MDR/XDR	94
APÊNDICE L – Correlação de MIC de STR e AMK de <i>M. tuberculosis</i> MDR/XDR	95
APÊNDICE M – Resultados de mutações em <i>rpoB</i> por Genotype MTBDRplus® de cepas de <i>M. tuberculosis</i> MDR/XDR	96
APÊNDICE N – Resultados de mutações em <i>katG</i> e região promotora de <i>inhA</i> por Genotype MTBDRplus® de cepas de <i>M. tuberculosis</i> MDR/XDR	97
APÊNDICE O – Resultados de mutações em <i>rpoB</i> , <i>katG</i> e região promotora de <i>inhA</i> por Genotype MTBDRplus® de cepas de <i>M. tuberculosis</i> sensíveis	98

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O aumento do problema da resistência aos fármacos de cepas do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) representa uma ameaça significativa para o controle eficaz da doença em algumas partes do mundo. Por isso a estimativa da resistência bacteriana tem assumido grande importância.¹

O presente estudo foi proposto em função de estudos que determinam a existência de diferentes níveis de resistência aos fármacos no tratamento da tuberculose (TB), principalmente para o auxílio na conduta terapêutica de casos de TB multirresistente (MDR) ou extensivamente resistente (XDR).

Assim, este estudo contribui para o conhecimento da concentração inibitória mínima (MIC) de cepas MDR e XDR de *M. tuberculosis*, podendo fornecer subsídios importantes para permitir melhor condução do tratamento, que se constitui de difícil manejo.

Pela primeira vez no estado de Minas Gerais foi verificado os níveis de resistência pela determinação do MIC de cepas de *M. tuberculosis* MDR e XDR para fármacos de primeira e segunda linha do tratamento da TB e detecção de mutações nas regiões *rpoB*, *katG* e *inhA*, demonstrando a originalidade do estudo.

¹WORLD HEALTH ORGANIZATION/INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE. Global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: fourth global report. WHO/HTM/TB/2008.394. Geneva: WHO, 2008a.

1.1 Introdução

1.1.1 A tuberculose

A TB caracteriza-se por uma doença infecto-contagiosa causada pelo bacilo *M. tuberculosis*. Afeta geralmente os pulmões, mas pode afetar outros sítios (TB extrapulmonar).² É uma doença de importância global e representa um sério problema de saúde pública envolvendo aspectos sociais e econômicos no Brasil e no mundo.^{2,3}

A doença é transmitida pelo ar quando pessoas que estão doentes com TB, principalmente pulmonar, expulsam as micobactérias, por exemplo, por meio da tosse.² Os sintomas clássicos da TB pulmonar são: tosse persistente, produtiva ou não (com muco e eventualmente sangue), febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento.³

Em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarou uma emergência global de saúde pública.⁴

De acordo com a OMS, em 2013, havia uma estimativa de 9 milhões de casos novos de TB no mundo e 1,5 milhão de mortes pela doença (cerca de 1,1 milhão de mortes entre pessoas HIV negativas e 360 mil entre pessoas HIV positivas). A taxa global de incidência média de TB equivale a 126 casos por 100 mil habitantes (Figura 1).⁵

No plano internacional, a OMS aponta os 22 países com maior carga de TB, que representam cerca de 80% dos casos estimados de incidência no mundo e são prioridade para o controle global da doença: Afeganistão, Bangladesh, Brasil, Camboja, China, República Democrática do Congo, Etiópia, Índia, Indonésia, Quênia, Moçambique, Mianmar, Nigéria, Paquistão, Filipinas, Federação Russa, África do Sul, Tailândia, Uganda, República Unida da Tanzânia, Vietnã e Zimbábue.⁵

²WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control: WHO report 2011. WHO/HTM/TB/2011.16. Geneva: **WHO**, 2011a.

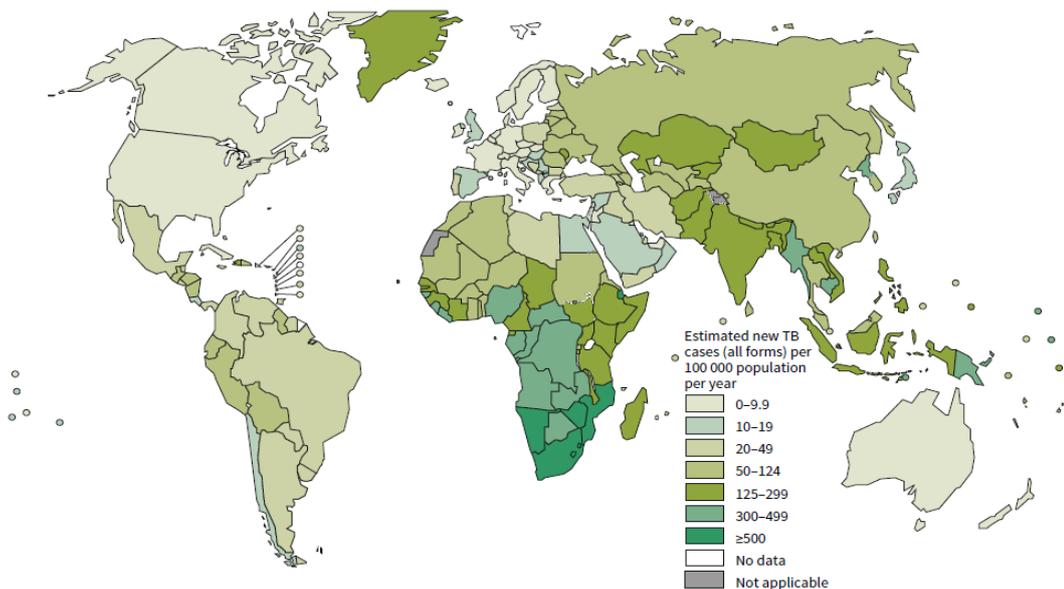
³BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011a. 284 p.

⁴WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3. Geneva: **WHO**, 2010.

⁵WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis report 2014. WHO/HTM/TB/2014.08. Geneva: **WHO**, 2014.

No mundo, mais de 90% dos casos de TB e das mortes ocorrem em países em desenvolvimento, sendo mais comum entre homens do que mulheres, e afeta principalmente adultos economicamente produtivos; cerca de dois terços dos casos são estimados de ocorrer entre as pessoas com idade entre 15-59 anos.²

Figura 1: Estimativa mundial das taxas de incidência de TB por 100 mil habitantes, 2013.



Fonte: WHO, 2014.⁵

1.1.2 A tuberculose no Brasil e em Minas Gerais

Entre os 22 países com maior carga de TB, o Brasil ocupa a 16^a posição em número absoluto de casos; por sua vez, Índia, China e Nigéria são os países com maior carga da doença. Ao ser considerado o coeficiente de incidência, o Brasil ocupa a 22^a posição entre esses países.⁵

Segundo estimativa da OMS, em 2012, o Brasil possuía uma incidência de 93 mil casos (46 novos casos por 100 mil habitantes) sendo a incidência de TB associada a HIV positivo de 13 mil casos.⁵

A média de mortalidade foi de 6.500 óbitos (1,5 casos por 100 mil habitantes). Desses, 2.100 casos são relacionados à TB associada a HIV positivo.⁵ No entanto, os dados do Programa

Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) informam taxa de mortalidade de 2,3 casos por 100 mil habitantes.⁶

Em 2013, o Brasil diagnosticou 71.123 casos novos de TB. Destaca-se que o coeficiente de incidência apresentou uma redução ao longo dos anos, de 44,4 por 100 mil habitantes para 35,4 por 100 mil habitantes, uma redução de 20,4% desde 2003.⁶

O sexo masculino apresentou um coeficiente de incidência de 50,2 por 100 mil habitantes (2,1 vezes maior que o do sexo feminino). Observa-se também que, entre os homens, a faixa etária mais acometida foi de 40 a 59 anos e entre as mulheres de 20 a 39 anos.⁶

Quando analisadas as regiões do Brasil para o ano de 2013, verifica-se que a Norte, Sudeste e Nordeste possuem, respectivamente, os mais altos coeficientes de incidência: 45,2, 37,1 e 34,7 por 100 mil habitantes.⁶

A concentração de casos encontra-se nas capitais e suas regiões metropolitanas, sendo que 70% dos casos estão em 315 municípios.³

No estado de Minas Gerais, cuja população é de 19.159.260 habitantes⁷, dos 853 municípios, 11 são prioritários para o Programa Nacional de Controle da Tuberculose.⁸ O estado representa a 4ª maior carga de TB do país (média simples de 6.085 casos por ano). Dados de 2013 revelam um coeficiente de incidência de 17,9 por 100 mil habitantes e de mortalidade de 1,4 por 100 mil habitantes.⁶

Entre 2008 e 2010, a taxa média de incidência de casos de TB pulmonar e extrapulmonar em Minas Gerais foram 21,1 por 100 mil habitantes. No mesmo período, foi notificada uma média de 4.198 casos novos de TB por ano.^{9,10}

⁶BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Boletim epidemiológico. **O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios**. v. 44(2). Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 13 p.

⁷INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Demográfico de 2010**. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010.

⁸BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: **Relatório de situação: Minas Gerais**. 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011b.

⁹BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Série histórica da taxa de incidência de tuberculose. Brasil, regiões e unidades federadas de residência por ano de diagnóstico (1990 a 2011)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012a.

¹⁰BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Série histórica de casos novos de tuberculose. Brasil, regiões e unidades federadas de residência por ano de diagnóstico (1990 a 2011)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012b.

Em Minas Gerais, entre 2002 e 2009, a maioria dos casos de TB foi observada na faixa etária de 20-49 anos e o sexo masculino o mais frequentemente acometido.¹¹

1.1.3 Tuberculose resistente aos fármacos no mundo

O surgimento da resistência aos fármacos em *M. tuberculosis* representa um fator que dificulta o controle da doença em todo o mundo.¹²

A TB causada por cepas do *M. tuberculosis* que são resistentes à, no mínimo, isoniazida e rifampicina é definida como TB multirresistente (MDR).⁴ Sua carga anual global é estimada em cerca de 480 mil casos (Figura 2 e 3).⁵

Quase 4% de todos os casos novos^a de TB e mais de 20% daqueles com história prévia de tratamento^b foram estimados ser TB MDR. No entanto, apenas cerca de 136 mil casos de TB MDR foram notificados à OMS em 2013, o que corresponde a menos de um terço dos casos estimados entre pacientes com TB pulmonar.⁵

A diferença entre casos notificados e estimados é devido ao acesso limitado ao teste de sensibilidade aos fármacos de primeira e segunda linha para o tratamento da TB em muitos países.¹³

¹¹AUGUSTO, C.J.; CARVALHO, W.S.; GONÇALVES, A.D.; CECCATO, M.G.B.; MIRANDA, S.S. Characteristics of tuberculosis in the state of Minas Gerais, Brazil: 2002-2009. **J Bras Pneumol.** v. 39(3), p. 357-364, 2013.

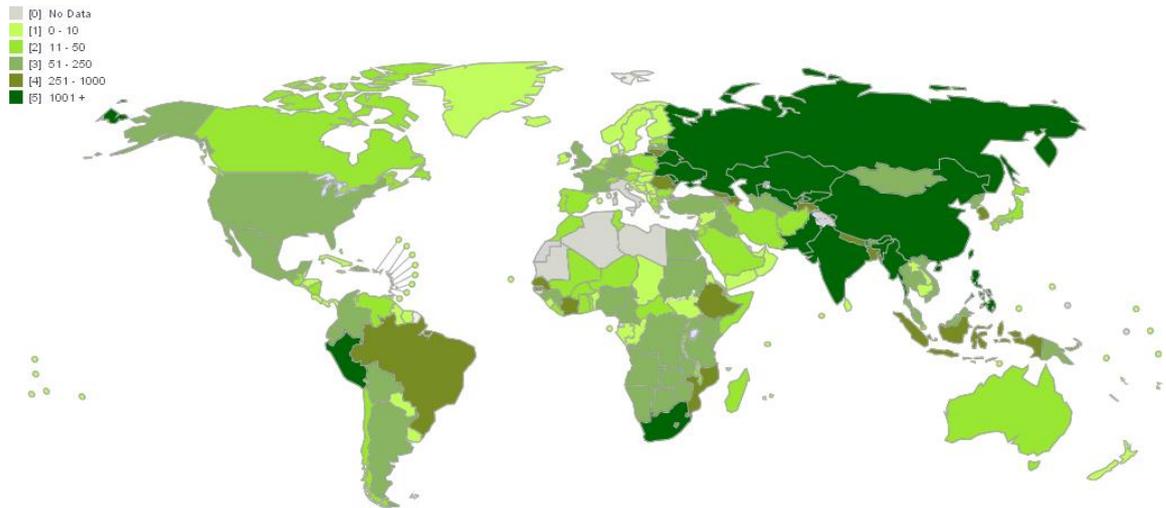
¹²LAWN, S.D.; ZUMLA, A.I. Tuberculosis. **Lancet.** v. 378, p. 57-72, 2011.

^aCaso novo: pacientes que nunca se submeteram ao tratamento para TB, ou tratados por até 30 dias.³

^bRetratamento ou tratamento prévio: pessoa já tratada para TB por mais de 30 dias, que venha a necessitar de novo tratamento por recidiva após cura ou retorno após abandono.³

¹³MATTEELLI, A.; ROGGI, A.; CARVALHO, A.C. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management. **Clin Epidemiol.** v. 6, p. 111-118, 2014.

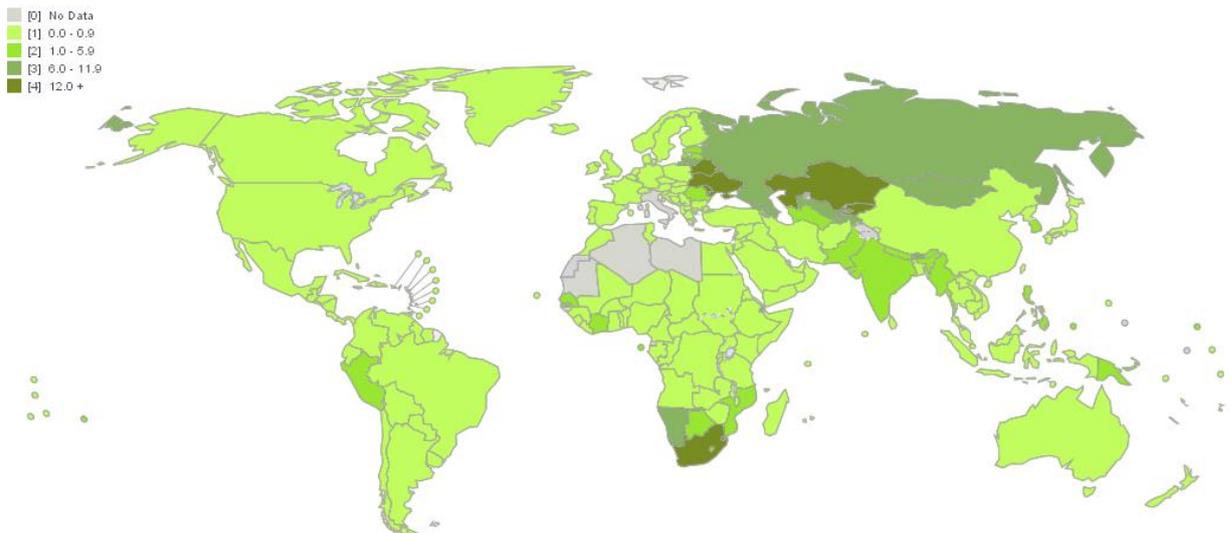
Figura 2: Número absoluto de casos de TB MDR notificados, 2013.



Fonte: WHO, 2014.⁵

Em 2013, segundo dados da OMS, de 1,5 milhão de mortes causadas por TB, havia uma estimativa de 210 mil mortes por TB MDR, um total relativamente alto comparado à incidência de 480 mil casos de TB MDR.⁵

Figura 3: Incidência de casos de TB MDR notificados por 100 mil habitantes, 2013.

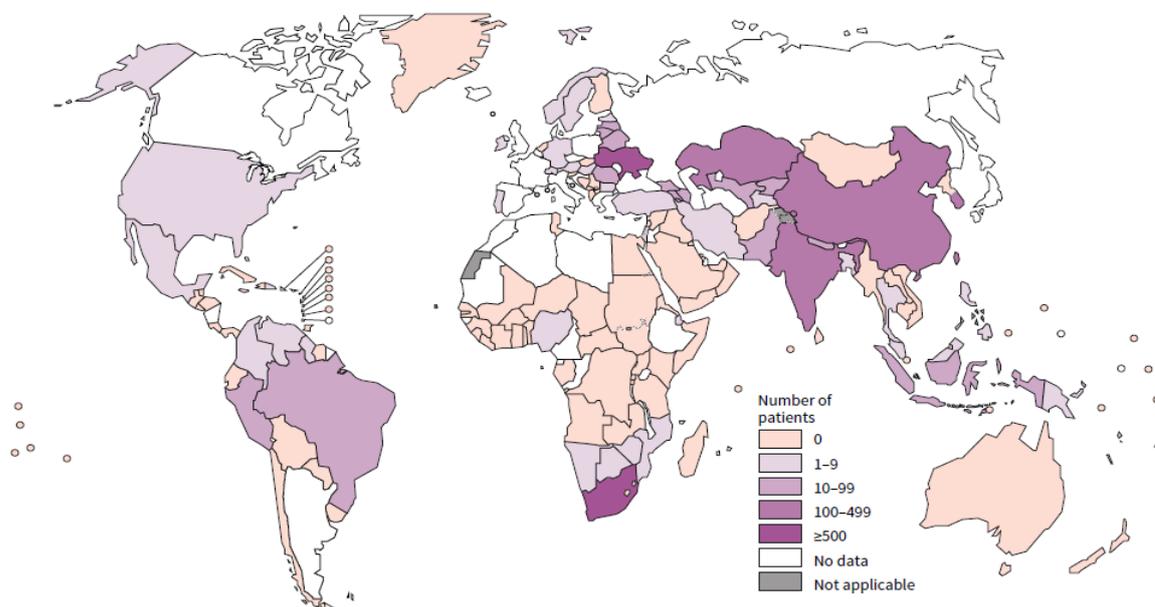


Fonte: WHO, 2014.⁵

Espera-se que cerca de 43.000 casos de TB MDR sejam de TB extensivamente resistente (XDR),⁵ forma causada por *M. tuberculosis* MDR com resistência adicional a uma fluorquinolona e no mínimo um fármaco do tratamento da TB de segunda linha injetável (amicacina, canamicina ou capreomicina).⁴

A figura 4 apresenta o número de pacientes com TB XDR confirmado laboratorialmente que iniciaram tratamento em 2013.

Figura 4: Número de pacientes com TB XDR confirmado laboratorialmente que iniciaram tratamento em 2013.



Fonte: WHO, 2014.⁵

Em suma, um dos desafios mais importantes enfrentados pelos programas de controle da TB é o surgimento e disseminação do *M. tuberculosis* resistente aos fármacos em todo o mundo, especialmente a TB MDR e XDR.⁵

1.1.4 Tuberculose resistente aos fármacos no Brasil e em Minas Gerais

Quanto à multirresistência aos fármacos do tratamento de primeira linha, dados do I Inquérito de Resistência do Brasil (1995-1996) mostraram que as taxas foram de 1,1% para pacientes

sem tratamento prévio (resistência primária^a) e de 7,9% para os pacientes que já haviam sido tratados (resistência adquirida^b).¹⁴ Dados atuais demonstraram a multirresistência no país de 1,4% para resistência primária e 7,5% para adquirida.⁵

Em Minas Gerais, segundo levantamento realizado por Augusto *et al.* (2013), entre 2002 e 2009, a TB MDR representou uma incidência de 0,2% dos casos notificados do estado, o que poderia estar subestimada devido a falta de realização de exames de cultura e teste de sensibilidade aos fármacos.^{11,15}

1.1.5 *Tratamento*

A TB é uma doença infecciosa grave, mas curável em praticamente a totalidade dos casos novos, desde que obedecidos os princípios da quimioterapia e assegure-se que não haja abandono do tratamento. A associação medicamentosa adequada, a dosagem correta, o uso por tempo suficiente e a adesão ao tratamento são os meios para evitar a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos. O diagnóstico precoce e o tratamento adequado são considerados as principais estratégias de controle da TB.³

O tratamento de casos novos de TB baseia-se primeiramente no uso de isoniazida, rifampicina com etambutol e pirazinamida como fármacos de primeira linha. Isoniazida e rifampicina são os fármacos mais efetivos para o tratamento da TB e têm sido utilizados como a base do tratamento no Brasil e na maioria dos países.⁴

O tratamento padrão para casos de TB MDR, segundo preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil, utiliza um fármaco injetável (estreptomicina) por no mínimo 6 meses, além de etambutol, levofloxacino, pirazinamida e terizidona, por 18 a 24 meses.³

^aResistência primária: resistência a um ou mais fármacos em pacientes de casos novos.³

^bResistência adquirida: verifica-se em pacientes com *M. tuberculosis* inicialmente sensível aos fármacos, que se tornam resistentes após tratamento prévio.³

¹⁴BRAGA, J.U.; BARRETO, A.M.W.; HIJAR, M.A. Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil 1995-97. Parte III: Principais resultados. **Boletim de Pneumologia Sanitária**. v. 11(1), p. 76-81, 2003.

¹⁵MÉDICINS SANS FRONTIÈRES. Out of Step. Deadly implementation gaps in the TB response. A survey of TB diagnostic and treatment practices in eight countries. Geneva: **MSF**, 2014.

O tratamento da TB XDR é muito mais complexo que o da TB MDR e consiste em uma combinação de fármacos.¹ Além disso, a limitação de fármacos disponíveis representa uma dificuldade para o tratamento.³

Segundo padronizado pelo PNCT, os fármacos capreomicina, clofazimina e ácido paraminossalicílico estão disponíveis apenas para o tratamento da TB XDR ou casos com critérios de falência para TB MDR.¹⁶

A Tabela 1 apresenta a classificação dos fármacos de tratamento da TB.

Tabela 1 - Classificação de grupos de fármacos utilizados no tratamento da TB

Classificação	Fármacos
Grupo 1 - Fármacos de primeira linha orais	Isoniazida, rifampicina, etambutol, rifabutina, pirazinamida
Grupo 2 - Fármacos injetáveis	Amicacina, canamicina, capreomicina, estreptomicina
Grupo 3 - Fluorquinolonas	Levofloxacino, ofloxacino, moxifloxacino
Grupo 4 - Fármacos de segunda linha orais	Cicloserina, terizidona, etionamida, protionamida, ácido p-aminossalicílico
Grupo 5 – Fármacos com eficácia não esclarecida ^a	Clofazimina, linezolida, tioacetazona, claritomicina, amoxicilina/clavulanato

^aFármacos grupo 5 não são recomendados para tratamento de casos de TB MDR. Fonte: WHO, 2008a.¹

A resistência de *M. tuberculosis* aos fármacos resulta em aumento da morbi-mortalidade e maiores custos para o serviço de saúde. Isoladamente, o custo dos fármacos para o tratamento de paciente com TB MDR é 50 a 200 vezes mais elevado que o tratamento de paciente com *M. tuberculosis* sensível aos fármacos.⁴

Além disso, as melhores medidas para evitar novos casos de TB XDR são o correto manejo dos pacientes com TB MDR, a detecção precoce e tratamento adequado de pacientes com TB XDR.¹³

¹⁶BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Esquemas individualizados para tratamento da tuberculose drogaresistente**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

1.1.6 Heterogeneidade da resistência bacteriana

O laboratório desempenha um papel crítico na identificação de casos de TB MDR e XDR, no entanto, como resultado da negligência histórica, poucos programas nacionais de TB têm capacidade para a realização de teste de sensibilidade (TS) aos fármacos de primeira linha e muito menos aos fármacos de segunda linha.^{15,17}

Atualmente, procedimentos estabelecidos para TS aos fármacos de *M. tuberculosis* classificam os isolados clínicos como “resistentes” ou “sensíveis”, com base na sua capacidade de crescer na presença de uma concentração única do fármaco, denominada “concentração crítica”.¹⁸

A concentração crítica é definida como a menor concentração do fármaco que inibe no mínimo 95% da cepa selvagem que não foi exposta previamente ao fármaco. Resistência em *M. tuberculosis* é definida pelo crescimento de $\geq 1\%$ de um inóculo bacilar na concentração crítica de um fármaco.¹⁹

Assim definida, a concentração crítica é um parâmetro epidemiológico usado para distinguir cepas de “selvagens” de “não selvagens”, sendo estas capazes de crescer na presença de concentrações mais elevadas de fármacos, que corresponde ao que é definido como o ponto de corte epidemiológico.²⁰ Como resultado desse procedimento, um isolado é categorizado como resistente em laboratório, independente de ter baixo, moderado ou alto nível de resistência aos fármacos.¹⁸

¹⁷WORLD HEALTH ORGANIZATION. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. WHO/HTM/TB/2008.392. Geneva: WHO, 2008b.

¹⁸BÖTTGER, E.C. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing. **Clin Microbiol Infect.** v. 17(8), p. 1128–1134, 2011.

¹⁹CANETTI, G.; FROMAN, S.; GROSSET, J.; HAUDUROY, P.; LANGEROVÁ, M.; MAHLER, H.T.; MEISSNER, G.; MITCHISON, D.A.; SULA, L. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. **Bull World Health Organ.** v. 29, p. 565–578, 1963.

²⁰SCHÖN, T.; JUREÉN, P.; GISKE, C.G.; CHRYSANTHOU, E.; STUREGÅRD, E.; WERNGREN, J.; KAHLMETER, G.; HOFFNER, S.E.; ÄNGEBY, K.A. Evaluation of wild-type MIC distributions as a tool for determination of clinical breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother.** v. 64, p. 786–793, 2009.

A concentração crítica muitas vezes tem pouca relação com as concentrações de fármacos presentes *in vivo*, e sua precisão na previsão de falha terapêutica pode estar, em parte, limitada.^{21,22}

Com o crescente conhecimento sobre os mecanismos que constituem a base da resistência aos fármacos, tornou-se claro que a resistência é heterogênea e a descoberta de diferentes mutações podem levar a diferentes níveis de resistência. A aquisição de uma alteração genética pode levar a uma diminuição da sensibilidade ao fármaco, mas não inevitavelmente excluí-lo de regimes de tratamento.²³ Assim, o MIC, que representa a menor concentração que inibe o crescimento bacteriano *in vitro*, pode definir os níveis de resistência aos fármacos.¹⁸

Os diferentes níveis têm importantes implicações biológicas, sendo concebível que o baixo nível de resistência, em parte, não corresponda a falha na terapêutica. Inversamente, na presença de um fenótipo de alto nível de resistência, o fármaco seja de pouco, ou nenhum benefício clínico. Já para o moderado, as implicações clínicas estão menos elucidadas.¹⁸

Embora o TS à “concentração crítica” seja certamente apropriado para a triagem, casos de resultados mostrando resistência aos fármacos devem ser complementados por medida quantitativa, em particular para os fármacos para os quais a heterogeneidade na resistência fenotípica está freqüentemente presente.²³

1.1.7 Sistema automatizado BACTEC® MGIT® 960

Os sistemas de cultura líquida têm sido utilizados para diagnóstico da TB e para TS aos fármacos de primeira^{24,25,26,27} e segunda linha,^{25,27,28,29,30} sendo o mais empregado e disponível

²¹BÖTTGER, E.C. Drug-resistant tuberculosis. **Lancet**. v. 357, p. 1288–1289, 2001.

²²BÖTTGER, E.C.; SPRINGER, B. Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. **Eur J Pediatr**. v. 167, p. 141–148, 2008.

²³SPRINGER, B.; LUCKE, K.; CALLIGARIS-MAIBACH, R.C.; RITTER, C.; BÖTTGER, E.C. Quantitative Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by Use of MGIT 960 and EpiCenter Instrumentation. **J Clin Microbiol**. v. 47(6), p. 1773–1780, 2009.

²⁴BEMER, P.; PALICOVA, F.; RÜSCH-GERDES, R.; DRUGEON, H.B.; PFYFFER, G.E. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC mycobacteria growth indicator tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**. v. 40, p. 150–154, 2002.

²⁵MORCILLO, N.; IMPERIALE, B.; Di GIULIO, B. Evaluation of MGIT 960™ and the colorimetric-based method for tuberculosis drug susceptibility testing. **Int J Tuberc Lung Dis**. v. 14(9), p. 1169–1175, 2010.

²⁶SAID, H.M.; KOCK, M.M.; ISMAIL, N.A.; BABA, K.; OMAR, S.V.; OSMAN, A.G.; HOOSSEN, A.A.; EHLERS, M.M. Comparison between the BACTEC MGIT 960 system and the agar proportion method for

comercialmente o BACTEC[®] MGIT[®] 960 (*Mycobacterial Growth Indicator Tube* - MGIT).³¹ É uma ferramenta rápida e confiável, tendo a vantagem de ser um sistema automatizado não-radiométrico.^{24,32} Esse sistema utiliza um sensor de fluorescência baseado na extinção de oxigênio do meio de cultura e permite o monitoramento contínuo do crescimento bacteriano.²⁴ Além disso, pode categorizar os níveis quantitativos de resistência aos fármacos.^{23,25,33,34,35,36,37,38}

susceptibility testing of multidrug resistant tuberculosis strains in a high burden setting of South Africa. **BMC Infect Dis.** v. 12, p. 369, 2012.

²⁷KRÜÜNER, A.; YATES, M.D.; DROBNIIEWSKI, F.A. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial susceptibility testing and determination of critical concentration of first- and second-line antimicrobial drugs with clinical drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** v. 44, p. 811–818, 2006.

²⁸RODRIGUES, C.; JANI, J.; SHENAI, S.; THAKKAR, P.; SIDDIQI, S. MEHTA, A. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against second-line drugs using the Bactec MGIT 960 System. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 12(12), p. 1449–1455, 2008.

²⁹SHARMA, M.; THIBERT, L.; CHEDORE, P.; SHANDRO, C.; JAMIESON, F. TYRRELL, G.; CHRISTIANSON, S.; SOUALHINE, H.; WOLFE, J. Canadian multicenter laboratory study for standardized second-line antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** v. 49(12), p. 4112–4116, 2011.

³⁰ZHAO, L.; XIA, Q.; LIN, N.; LIU, B.; ZHAO, X.; LIU, Z.; WAN, K. Evaluation of BACTEC MGIT 960 system for the second-line drugs susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in China. **J Microbiol Methods.** v. 91(1), p. 212–214, 2012.

³¹SIDDIQI, S.H.; RÜSCH-GERDES, S. MGIT Procedure manual for BACTEC[™] MGIT[™] 960 TB system. Foundation for Innovative New Diagnostics. **Becton Dickinson**, Sparks, MD, USA: 2006.

³²RÜSCH-GERDES, S.; DOMEHL, C.; NARDI, G.; GISMONDO, M.R.; WELSCHER, H.; PFYFFER, G.E. Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. **J Clin Microbiol.** v. 37(1), p. 45–48, 1999.

³³MPAGAMA, S.G.; HOUP, E.R.; STROUP, S.; KUMBURU, H.; GRATZ, J.; KIBIKI, G.S.; HEYSELL, S.K. Application of quantitative second-line drug susceptibility testing at a multidrug-resistant tuberculosis hospital in Tanzania. **BMC Infect Dis.** v. 13, p. 432, 2013.

³⁴SIRGEL, F.A.; TAIT, M.; WARREN, R.M.; STREICHER, E.M.; BÖTTGER, E.C.; VAN HELDEN, P.D.; VAN PITTIUS, N.C.G.; COETZEE, G.; HOOSAIN, E.Y.; CHABULA-NXIWENI, M.; HAYES, C.; VICTOR, T.C.; TROLLIP, A. Mutations in the rrs A1401G gene and phenotypic resistance to amikacin and capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microb Drug Resist.** v. 18(2), p. 193–197, 2012a.

³⁵SIRGEL, F.A.; WARREN, R.M.; STREICHER, E.M.; VICTOR, T.C.; VAN HELDEN, P.D.; BÖTTGER, E.C. gyrA mutations and phenotypic susceptibility levels to ofloxacin and moxifloxacin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother.** v. 67(5), p. 1088–1093, 2012b.

³⁶KHANNA, A.; RAJ, V.S.; TARAI, B.; SOOD, R.; PAREEK, P.K.; UPADHYAY, D.J.; SHARMA, P.; RATTAN, A.; SAINI, K.S.; SINGH, H. Emergence and molecular characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the Delhi Region in India. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 54(11), p. 4789–4793, 2010.

³⁷JAMIESON, F.B.; GUTHRIE, J.L.; NEEMUCHWALA, A.; LASTOVETSKA, O.; MELANO, R.G.; MEHAFFY, C. Profiling of rpoB mutations and MICs for rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** v. 52(6), p. 2157–2162, 2014.

³⁸ZHANG, Z.; WANG, Y.; PANG, Y.; KAM, K.M. Ethambutol resistance as determined by broth dilution method correlates better than sequencing results with embB mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **J Clin Microbiol.** v. 52(2), p. 638–641, 2014.

1.1.8 Mutações e Genotype MTBDRplus®

Resistência à rifamicinas em *M. tuberculosis* é largamente associada às mutações dentro da região determinante de resistência à rifampicina (RRDR) de 81 pares de base em *rpoB*, que corresponde aos códons 507 a 533 de RpoB.^{39,40,41}

A resistência à isoniazida é associada principalmente com mutações ou deleções no gene *katG* e região do promotor do gene *inhA*. A mutação mais frequente em *katG* localiza-se no códon 315 (substituição do aminoácido serina por treonina e em *inhA* na posição -15 (substituição de base nitrogenada citosina por timina).^{42,43}

A OMS recomenda o uso de testes moleculares como o Genotype MTBDRplus® para diagnosticar a TB e TB MDR em países em desenvolvimento e com alta carga da doença.¹⁷

O Genotype MTBDRplus® (*Hain Lifescience, Nehren, Alemanha*) é um ensaio comercial de hibridização reversa com sonda de DNA projetado para detecção de mutações nos genes *rpoB* que conferem resistência à rifampicina, e *katG* e região promotora de *inhA* relacionados à resistência à isoniazida.⁴⁴

³⁹RAMASWAMY, S.; MUSSER, J.M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. **Tuber Lung Dis.** v. 79, p. 3–29, 1998.

⁴⁰YANG, B.; KOGA, H.; OHNO, H.; OGAWA, K.; FUKUDA, M.; HIRAKATA, Y.; MAESAKI, S.; TOMONO, K.; TASHIRO, T.; KOHNO, S. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother.** v. 42, p. 621–628, 1998.

⁴¹SCHÖN, T.; JURÉEN, P.; CHRYSANTHOU, E.; GISKE, C.G.; KAHLMETER, G.; HOFFNER, S.; ANGEBY, K. Rifampicin-resistant and rifabutin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains: a breakpoint artefact? **J Antimicrob Chemother.** v. 68, p. 2074–2077, 2013.

⁴²RAMASWAMY, S.V.; REICH, R.; DOU, S.J. et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemoter.** v. 47, p. 1241-50, 2003.

⁴³CARDOSO, R.F.; COOKSEY, R.C.; MORLOCK, G.P.; BARCO, P.; CECON, L.; FORESTIERO, F.; LEITE, C.Q.F.; SATO, D.N.; SHIKAMA, M.L.; MAMIZUKA, E.M.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v.48, p. 3373-381, 2004.

⁴⁴MIOTTO, P.; PIANA, F.; CIRILLO, D.M.; MIGLIORI, G.B. Genotype MTBDRplus: a further step toward rapid identification of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.** v. 46, p. 393–394, 2008.

1.2 Justificativa

O advento da TB MDR e XDR representa um problema no tratamento e está relacionado a altas taxas de mortalidade desses pacientes. Com isso, tem-se aumentado a importância da condução de TS *in vitro* não apenas para fármacos de primeira como também de segunda linha.^{13,28,45,46,47,48}

TB MDR e XDR tornou-se uma séria ameaça para o controle global da doença como resultado da dificuldade no diagnóstico e tratamento e é associada ao alto custo dos programas de controle da TB, por requerer o uso de fármacos de segunda linha.¹⁷ Esses fármacos são menos eficazes, mais caros e muito mais tóxicos do que os fármacos de primeira linha. A taxa de sucesso do tratamento de TB resistente aos fármacos, particularmente MDR ou XDR, é significativamente menor que a da TB sensível aos fármacos.^{13,46,47}

Com a ascensão global de TB MDR e XDR,⁵ há uma necessidade crescente de determinar os níveis de resistência aos fármacos de tratamento da TB de primeira e segunda linha com precisão.¹⁸ Segundo Böttger (2011), o tratamento de pacientes com TB resistente aos fármacos deve ser baseado em medidas quantitativas de teste de sensibilidade, para a prevenção do aumento de resistência.¹⁸ Esta pode ser a razão pela qual mais de um terço do tratamento dos casos de TB MDR em tratamento padrão tem sido eficaz, provavelmente devido ao baixo nível de resistência.^{21,49}

Assim, a simples categorização de isolados clínicos de *M. tuberculosis* como “resistentes” com base em TS à concentração crítica precisa ser revista e completada por testes de medidas

⁴⁵GANDHI, N. R.; MOLL, A.; STURM, A.W.; PAWINSKI, R.; GOVENDER, T.; LALLOO, U.; ZELLER, K.; ANDREWS, J.; FRIEDLAND, G. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa **Lancet**. v. 368, 1575–80, 2006.

⁴⁶CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs - Worldwide, 2000–2004. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**. v. 55, p. 301–305, 2006.

⁴⁷JAIN, A.; MONDAL, R. Extensively drug-resistant tuberculosis: current challenges and threats. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 53(2), p. 145-150, 2008.

⁴⁸LIN, S.Y.; DESMOND, E.; BONATO, D.; GROSS, W.; SIDDIQI, S. Multicenter evaluation of Bactec MGIT 960 system for second-line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J Clin Microbiol**.v. 47 (11), p. 3630-3634, 2009.

⁴⁹ESPINAL, M.A.; KIM, S.I.; SUAREZ, G.; KAM, K.M.; KHOMENKO, A.G.; MIGLIORI, G.B.; BAE'Z, J.; KOCHI, A.; DYE, C.; RAVLIGIONE, M.C. Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: treatment outcomes in 6 countries. **JAMA**. v. 283, p. 2537–2545, 2000.

quantitativas para demonstrar a existência de diferentes níveis da resistência, no intuito de melhor avaliar os fármacos disponíveis para o tratamento.¹⁸

Além disso, a vigilância da resistência aos fármacos do tratamento da TB é essencial para fornecer informações sobre a magnitude e tendências da resistência para o desenvolvimento de diretrizes de um tratamento adequado e para avaliar o impacto das intervenções dos programas de controle da doença.⁴

De fato, a definição de um tratamento adequado representa um determinante essencial para um resultado favorável, e a determinação rápida da resistência ao fármaco pode permitir uma abordagem personalizada para o tratamento.⁵⁰

A avaliação das mutações dos genes que conferem resistência à isoniazida e à rifampicina leva a uma discussão das relações envolvidas dessas mutações e os níveis de resistência.¹⁸

Além disso, em Minas Gerais não há estudos sobre níveis de resistência de cepas multirresistentes para os principais fármacos dos esquemas terapêuticos padronizados no Brasil e suas relações com as mutações nas regiões *rpoB*, *katG* e *inhA*.

⁵⁰ORENSTEIN, E.W.; BASU, S.; SHAH, N.S.; ANDREWS, J.R.; FRIEDLAND, G.H.; MOLL, A.P.; GANDHI, N.R.; GALVANI, A.P. Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis.** v. 9, p. 153-161, 2009.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a concentração inibitória mínima dos fármacos de primeira e segunda linha e mutações relacionadas à isoniazida e rifampicina de isolados clínicos de *M. tuberculosis* multirresistente em laboratório de referência do estado de Minas Gerais.

2.2 Objetivos específicos

Determinar os níveis do MIC dos fármacos isoniazida, rifampicina, estreptomicina, etambutol, amicacina, levofloxacina, rifabutina e cicloserina em cepas do *M. tuberculosis* pelo método automatizado BACTEC® MGIT® 960.

Correlacionar os valores do MIC entre rifampicina e rifabutina e entre estreptomicina e amicacina.

Associar os níveis de resistência às mutações nas regiões *rpoB*, *katG* e *inhA*.

Correlacionar os valores do MIC entre os casos de resistência primária ou adquirida.

3 METODOLOGIA DETALHADA

3.1 Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) sob o parecer 122.941 (CAAE 06611912.8.0000.5149).

3.2 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo com 115 cepas do *M. tuberculosis*, estocadas em freezer a -70°C , correspondentes a 97 pacientes (amostras de conveniência), provenientes de amostras clínicas pulmonares, identificadas como multirresistentes no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais (LACEN-MG) – Instituto Octávio Magalhães - Fundação Ezequiel Dias (FUNED), do período de janeiro de 2008 a dezembro de 2011.

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Micobactérias do Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas da FUNED, localizado na cidade de Belo Horizonte, laboratório de referência para teste de sensibilidade aos fármacos de primeira linha e identificação de *M. tuberculosis*.

A identificação de *M. tuberculosis* foi realizada com base em suas características fenotípicas, tais como aspecto das colônias, tempo de crescimento, álcool-ácido resistência, inibição do crescimento em meio com ácido p-nitrobenzóico 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, resistência à hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, produção de niacina e redução de nitrato.^{51,52}

O teste de sensibilidade das cepas do estudo no referido período foi realizado pelo método das proporções em meio de cultura Löwenstein Jensen (LJ) ou BACTEC[®] MGIT[®] 960 com concentração crítica padrão conforme Tabela 2.

⁵¹BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 436 p.

⁵²LEÃO, S.C.; MARTIN, A.; MEJIA G.I.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M.A.S.; PORTAELS, F. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria**. Printed by Vanden Broelle, Brugges, Belgium, 2004.164 p.

Como rotina do laboratório da FUNED para confirmação dos casos de TB MDR e teste de sensibilidade para fármacos de segunda linha (amicacina, ofloxacino, capreomicina e canamicina), os isolados clínicos são encaminhados para o Laboratório de Referência Nacional em Tuberculose – Centro de Referência Professor Hélio Fraga (CRPHF) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os testes de sensibilidade para esses fármacos foram realizados pelo método BACTEC® MGIT® 960 (Tabela 2). A sensibilidade pelo método das proporções não foi testada para os fármacos cicloserina e rifabutina.

Tabela 2 - Concentração crítica de fármacos para teste de sensibilidade pelo método das proporções em LJ e BACTEC® MGIT® 960.

Fármacos	Concentrações (µg/mL)	
	LJ	BACTEC® MGIT® 960
INH	0,2	0,1
RIF	40	1
STR	4	1
EMB	2	5
AMK	-	1
OFX	-	2

INH: isoniazida; RIF: rifampicina; STR: estreptomicina; EMB: etambutol; AMK: amicacina; OFX: ofloxacino. LJ: Löwenstein Jensen. Fonte: SIDDIQI; RÜSCH-GERDES, 2006;³¹ SIRGEL *et al.*, 2012a;³⁴ SIRGEL *et al.*, 2012b;³⁵ BRASIL, 2008.⁵¹

A determinação do MIC foi realizada para os fármacos isoniazida (INH), rifampicina (RIF), estreptomicina (STR), etambutol (EMB), levofloxacino (LVX), amicacina (AMK), rifabutina (RFB) e cicloserina (CIC). LVX foi utilizado em substituição a ofloxacino (OFX) devido a sua resistência cruzada e serem da mesma classe, além do que o tratamento de MDR no país é realizado com LVX.^{3,53}

⁵³DEVASIA, R.A.; BLACKMAN, A.; MAY, C.; EDEN, S.; SMITH, T.; HOOPER, N.; MARURI, F.; STRATTON, C.; SHINTANI, A.; STERLING, T.R. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*:

Dez cepas sensíveis aos fármacos de primeira linha (STR, INH, RIF e EMB) pelo método das proporções em LJ ou BACTEC® MGIT® 960 foram aleatoriamente escolhidas no referido período como controle do MIC, além da realização do teste em duplicata (índice Kappa de 0,98 = muito boa concordância).⁵⁴

Foi incluída no estudo uma cepa de referência de *M. tuberculosis* ATCC 27294 como controle do meio de cultura e dos fármacos.

A correlação entre os valores de MIC de RIF e RFB foi verificada, pois os dois fármacos são da classe das rifamicinas.⁵⁵ Já STR e AMK são da classe dos aminoglicosídeos.⁵⁶

Para definição das cepas de casos de resistência primária ou adquirida foi realizado consulta em ficha de informação laboratorial e/ou Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN).

A determinação do MIC e detecção das mutações foram realizadas de forma cega.

A manipulação do material biológico nos procedimentos laboratoriais ocorreram segundo as normas de biossegurança vigentes.⁵¹

3.3 Tamanho amostral

Foram utilizadas amostras de conveniência da coleção de cepas do *M. tuberculosis* MDR do LACEN-MG do período de 2008 a 2011. Caso fosse considerado o cálculo amostral com intervalo de confiança de 95% e um nível de significância de 5%, o tamanho amostral seria de 40 cepas do *M. tuberculosis* MDR.

an assessment of MGIT 960, MODS and nitrate reductase assay and fluoroquinolone cross-resistance. **J Antimicrob Chemother.** v. 63, p. 1173–1178, 2009.

⁵⁴BRAILE, D.M.; GODOY, M.F. **Cálculos Estatísticos Básicos para Testes Diagnósticos**, 1999.

⁵⁵MARSILI, L.; PASQUALUCCI, C.R.; VIGEVANI, A.; GIOIA, B.; SCHIOPPACASSI, G.; ORONZO, G. New rifamycins modified at positions 3 and 4. Synthesis, structure and biological evaluation. **J Antibiot.** v. 34, p. 1033–1038, 1981.

⁵⁶ARBEX, M.A.; VARELLA, M.C.L.; DE SIQUEIRA, H.R.; DE MELLO, F.A.F. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs. **J Bras Pneumol.** v. 36(5), p. 641-656, 2010.

3.3.1 Critério de inclusão

Cepa viável de *M. tuberculosis* MDR por paciente com resultado de teste de sensibilidade pelo método das proporções em LJ ou BACTEC[®] MGIT[®] 960.

3.3.2 Critérios de exclusão

Isolados de micobactéria não tuberculosa;

Isolados de *M. tuberculosis* contaminados com fungos ou outras bactérias;

Crescimento de *M. tuberculosis* menor que 20 unidades formadoras de colônias (UFC) por inviabilizar a realização do MIC.

3.4 Viabilidade das cepas bacterianas

Cepas de *M. tuberculosis* MDR estocadas em freezer -70°C foram descongeladas e 100µL inoculados em meio LJ previamente identificado com número de registro laboratorial correspondente. Posteriormente realizou-se incubação em estufa bacteriológica a 36°C±1. Foi realizado monitoramento semanal de crescimento bacteriano característico de *M. tuberculosis* até oito semanas.⁵¹

Como forma de melhorar a recuperação das cepas bacterianas, foi também realizado inóculo de 100µL de isolado descongelado em meio Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase) e glicerol, contido em tubos de vidro estéreis previamente identificados com respectivo número de registro laboratorial da cepa e posterior incubação em estufa bacteriológica a 36°C±1 por 21 dias. Após este período, foi realizado repique em meio LJ.⁵¹

Após realização de viabilidade, foi selecionada uma cepa que representou cada paciente.

3.5 Fármacos

Os fármacos INH, RIF, STR, EMB, AMK, LVX, CIC e RFB foram obtidos na forma química pura (Sigma Aldrich®) e foram dissolvidos em solução estoque de acordo com a Tabela 3. As soluções estoque foram preparadas a 5376 µg/mL (10752 µg/mL para CIC) levando em consideração a potência do fármaco e mantidas em alíquotas a -70°C por até seis meses.

Tabela 3 - Fármacos utilizados com seus respectivos solventes.

Fármacos	Solventes
INH, STR, EMB, AMK e CIC	H ₂ O
RIF e RFB	Metanol
LVX	H ₂ O + NaOH 0,1N

INH: isoniazida; STR: estreptomicina; EMB: etambutol; AMK: amicacina; CIC: cicloserina; RIF: rifampicina; RFB: rifabutina; LVX: levofloxacino. Fonte: CLSI, 2012.⁵⁷

Soluções de uso foram preparadas a partir das soluções estoque e foram realizadas diluições duplas seriadas em água destilada estéril de maneira a obter concentrações variadas para cepas sensíveis (Tabela 4) e resistentes (Tabela 5).

⁵⁷CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes; Approved Standard – Second Edition. CLSI document M24-A2. Wayne, Pennsylvania: **Clinical and Laboratory Standards Institute**. v. 31(5), 2011. 14 p.

Tabela 4 - Concentrações dos fármacos testados para MIC em BACTEC® MGIT® 960 de *M. tuberculosis* sensíveis.

Fármacos	Concentrações (µg/mL)
INH	0,007; 0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4
RIF	0,007; 0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4
STR	0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8
EMB	0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16
AMK	0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4
LVX	0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8
CIC	1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16; 32; 64; 128
RBF	0,007; 0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4

INH: isoniazida; RIF: rifampicina; STR: estreptomicina; EMB: etambutol; AMK: amicacina; LVX: levofloxacino; CIC: cicloserina; RFB: rifabutina. Fonte: Adaptado de MPAGAMA *et al.*, 2013.³³

Tabela 5 - Concentrações dos fármacos testados para MIC em BACTEC® MGIT® 960 de *M. tuberculosis* resistentes.

Fármacos	Concentrações (µg/mL)
INH	0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32
RIF	0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64
STR	0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64
EMB	0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64
AMK	0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32
LVX	0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64
CIC	0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16; 32; 64; 128
RBF	0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16

INH: isoniazida; RIF: rifampicina; STR: estreptomicina; EMB: etambutol; AMK: amicacina; LVX: levofloxacino; CIC: cicloserina; RFB: rifabutina. Fonte: Adaptado de MPAGAMA *et al.*, 2013.³³

3.6 Concentração inibitória mínima pelo método BACTEC® MGIT® 960

O MIC foi determinado para todas as cepas de MDR com o perfil de sensibilidade definido como sensíveis ou resistentes para os fármacos de primeira e de segunda linha STR, INH, RMP, EMB, AMK e LVX.

Devido à indisponibilidade dos fármacos CIC e RFB foi determinado o MIC de 32 cepas para CIC e 28 para RFB.

O MIC também foi determinado para as 10 cepas sensíveis e a cepa de referência ATCC.

A determinação do MIC foi realizada utilizando o sistema automatizado BACTEC® MGIT® 960 (*BD Bioscience, Sparks, MD, USA*) conforme recomendação do fabricante.³¹

Tubos MGIT contendo meio Middlebrook 7H9 foram suplementados com 800µL de OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase).

Para os tubos contendo fármacos, 100 µL da respectiva diluição do fármaco foram adicionados ao tubo MGIT.^{23,51} Foi utilizado um tubo MGIT como controle de crescimento bacteriano (CC) ao qual não foi adicionado fármaco.

Foi utilizado o primeiro repique das cepas após congelamento a -70°C. Suspensão bacteriana foi preparada a partir de culturas puras frescas de até quatro semanas⁵⁸ em meio LJ a 37°C com a transferência de colônias para tubos de vidro estéreis contendo 3 mL de água destilada estéril e 5 pérolas de vidro. Os tubos foram agitados por no mínimo 60 segundos para permitir homogeneização. Aguardou-se 10 minutos para sedimentação de partículas pesadas.

O sobrenadante foi transferido para tubos estéreis contendo água destilada estéril e diluído até atingir a turbidez correspondente à escala padrão 0,5 de McFarland. A partir dessa suspensão, foi realizada diluição 1:5 em água destilada estéril. Esta diluição foi utilizada para inóculo de 500µL em cada tubo contendo fármaco. A partir da mesma suspensão, foi realizada diluição 1:100 em água destilada estéril. Esta diluição foi utilizada para inóculo de 500µL em cada tubo CC.^{23;51}

⁵⁸ÅDJERS-KOSKELA, K.; KATILA, M. Susceptibility testing with the manual mycobacteria growth indicator tube (MGIT) and the MGIT 960 system provides rapid and reliable verification of multidrug-resistant tuberculosis. **J Clin Microbiol.** v. 41(3), p. 1235-1239, 2003.

O conjunto de tubos foi inserido no equipamento BACTEC® MGIT® 960, incubado a $36^{\circ}\text{C}\pm 1$ e monitorado continuamente até positividade por até 21 dias.

O MIC para cada fármaco foi definido como a menor concentração em que a cepa foi considerada sensível.²³ Um tubo com determinado fármaco foi considerado resistente quando foi positivo até dois dias após a positividade do tubo CC. Um tubo contendo fármaco foi considerado sensível quando não foi positivo após dois dias da positividade do tubo CC.⁵⁸

Alíquotas de meio de cultura dos tubos positivos foram coradas pelo método de Ziehl Neelsen para verificação de contaminação.⁵¹

O ponto de corte de resistência estabelecido para MIC foi definido de acordo com Mpagama *et al.*, 2013.³³ As cepas com MIC acima do ponto de corte foram definidas como resistentes. As cepas com MIC igual ou menor que o ponto de corte foram definidas como sensíveis.

Tabela 6 – Pontos de corte de resistência para MIC de fármacos de primeira e segunda linha em BACTEC® MGIT® 960 de *M. tuberculosis*.

Fármacos	Ponto de corte ($\mu\text{g/mL}$)
INH	>0,25
RIF	>1
STR	>2
EMB	>4
AMK	>1
LVX	>2
CIC	>32
RFB	>0,5

INH: isoniazida; RIF: rifampicina; STR: estreptomicina; EMB: etambutol; AMK: amicacina; LVX: levofloxacino; CIC: cicloserina; RFB: rifabutina. Fonte: MPAGAMA *et al.*, 2013.³³

Os níveis de resistência foram definidos arbitrariamente para os referidos fármacos após cálculo das medianas e percentis 25 e 75 como o estudo de Jamieson *et al.*, 2014.³⁷ Para INH foram classificados três categorias, baixo ($>0,25$ a ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$), moderado (4 $\mu\text{g/mL}$) e alto (≥ 8

$\mu\text{g/mL}$). Os níveis de RIF foram definidos como baixo (>1 a ≤ 16 $\mu\text{g/mL}$) e alto (≥ 32 $\mu\text{g/mL}$); STR como baixo (>2 a ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$) e alto (≥ 8 $\mu\text{g/mL}$); EMB como baixo (>4 a ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$) e alto (≥ 16 $\mu\text{g/mL}$); LVX como baixo (>2 a ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$) e alto (≥ 8 $\mu\text{g/mL}$); RFB como baixo ($>0,5$ a ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$) e alto (≥ 8 $\mu\text{g/mL}$). Para AMK foi definido apenas o alto nível (≥ 32 $\mu\text{g/mL}$).

Para os valores de MIC que ficaram abaixo do ponto de corte de resistência os níveis de resistência não foram definidos.

3.7 Genotype MTBDRplus[®]

Genotype MTBDRplus[®] (Hain Life Sciences, Nehren, Germany) consiste em um ensaio baseado em amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção de mutações nas regiões *rpoB* e *katG* e *inhA* (resistência á INH).⁴⁴

Foi realizada o ensaio Genotype MTBDRplus[®] em 53 isolados de *M. tuberculosis*, sendo 42 MDR/XDR, 10 sensíveis e uma de referência ATCC conforme recomendação do fabricante.

3.8 Análises estatísticas

Foi utilizado software SPSS versão 18 para cálculo estatístico com intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%.

A proporção dos níveis de resistência foi reportada como frequência simples de ocorrência para cada fármaco.

As correlações entre os MIC de RIF e RFB e entre os MIC de STR e AMK foram realizadas pelo teste de correlação ρ de Spearman.

A associação entre os níveis de resistência e as mutações em *rpoB* (RIF e RFB) e *katG* e *inhA* (INH) foi calculada por meio do teste Exato de Fisher.

Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), acurácia e concordância (índice *Kappa*) entre a detecção de resistência do Genotype

MTBDRplus[®] e o teste de sensibilidade foram calculados de acordo com Braile & Godoy, 1999.⁵⁴

A correlação dos níveis do MIC entre os casos de resistência primária ou adquirida para os referidos fármacos foi realizada também pelo teste de correlação ρ de Spearman.

4 ARTIGO

Nota explicativa

Seguindo uma das orientações do Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical, a dissertação de mestrado deve conter um artigo a ser submetido em uma revista indexada. Nesta dissertação está incluído um artigo a ser submetido à revista *Journal of Clinical Microbiology* (Fator de impacto em 2013 de 4.232 e classificada Qualis A1).

Título: “Níveis de resistência aos fármacos de primeira e segunda linha do *Mycobacterium tuberculosis* MDR/XDR e mutações em *rpoB*, *katG* e *inhA* em Minas Gerais, Brasil”.

Níveis de resistência aos fármacos de primeira e segunda linha do *Mycobacterium tuberculosis* MDR/XDR e mutações em *rpoB*, *katG* e *inhA* em Minas Gerais, Brasil.

Alan Douglas Gonçalves^a, Cláudio José Augusto^a, Pedro Almeida da Silva^b, Wânia da Silva Carvalho^c, Silvana Spíndola de Miranda^{d#}.

Fundação Ezequiel Dias, Minas Gerais, Brasil^a; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil^b; Departamento de Farmácia Social/Faculdade de Farmácia/Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil^c; Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil^d.

#Endereço de correspondência para Silvana Spíndola de Miranda: silvanaspindola@gmail.com.

A simples categorização de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* como “resistentes” com base em teste de sensibilidade à concentração crítica não contempla os diferentes níveis de resistência, por isso a necessidade de determinar o MIC para conduzir o tratamento adequado, principalmente em cepas multirresistente (MDR) e extensivamente resistente (XDR). Esse estudo teve como objetivo avaliar os níveis de resistência dos fármacos de primeira e segunda linha do *M. tuberculosis* MDR/XDR e a relação com mutações nas regiões *rpoB*, *katG* e *inhA*. O MIC foi utilizado para avaliar o nível de resistência em 42 cepas e o Genotype MTBDRplus[®] em 40 cepas. O baixo nível de resistência foi observado em 40% das cepas resistentes à isoniazida (INH); 13,5% à rifampicina (RIF); 31,2% à estreptomicina (STR); 33,3% à etambutol e à levofloxacino (LVX); 38,9% à rifabutina (RFB). Em relação às mutações da região *rpoB* e os níveis de resistência à RIF, a mutação D516V foi associada à baixo nível. A mutação S531L em *rpoB* foi associada à baixo

nível de resistência à RFB enquanto que a mutação H526Y foi associada à alto nível. Em relação às mutações em *katG* e *inhA*, a mutação S315T *katG* foi associada à moderado nível de resistência à INH, enquanto as mutações simultâneas S315T *katG* e C15T *inhA* foram associadas à alto nível. A determinação dos níveis de resistência para fármacos de primeira e segunda linha e a detecção de mutações podem oferecer melhores informações acerca de regimes terapêuticos para pacientes com *M. tuberculosis* MDR e XDR.

Palavras Chave: Resistência a multimedicamentos. Diagnóstico. Testes de sensibilidade microbiana.

Um dos desafios mais importantes enfrentados pelos programas de controle da tuberculose (TB) é o surgimento e disseminação do *M. tuberculosis* resistente aos fármacos (1). A ameaça representada pela TB aumenta com a emergência da TB multirresistente (MDR), definida como a TB causada por cepas de *M. tuberculosis* resistentes a, no mínimo, isoniazida e rifampicina, além do surgimento da TB extensivamente resistente (XDR), definida como TB MDR com resistência adicional a uma fluorquinolona e no mínimo um fármaco de segunda linha injetável (amicacina, canamicina ou capreomicina) (2).

Segundo a OMS, os dados globais de casos TB MDR primária representam 3,5% enquanto que casos de adquirida, 20,5% (1). Dados atuais do Brasil demonstram TB MDR primária de 1,4% e adquirida, 7,5% (1).

Frequentemente os testes de sensibilidade (TS) aos fármacos utilizados no tratamento da TB classificam os isolados clínicos como resistentes ou sensíveis, utilizando como balizador para esta classificação a concentração crítica do fármaco testado (3). Embora útil, essa abordagem apresenta a limitação de não determinar os níveis de resistência, que eventualmente poderia ser revertida com o uso do mesmo fármaco em uma nova posologia (3). Considerando a

escassez de fármacos para o tratamento da TB, é urgente uma abordagem mais acurada para a determinação do perfil de resistência.

Resistência à rifamicinas do *M. tuberculosis* é largamente associada às mutações dentro da região determinante de resistência à rifampicina (RRDR) de 81 pares de base na região *rpoB*, que corresponde aos códons 507 a 533 de RpoB (4,5,6).

A resistência à isoniazida está associada principalmente com mutações ou deleções no gene *katG* e região do promotor do gene *inhA*. A mutação mais frequente em *katG* localiza-se no códon 315 (substituição do aminoácido serina por treonina e em *inhA* na posição -15 (substituição de base nitrogenada citosina por timina) (7,8).

Testes para detecção do *M. tuberculosis* MDR que detectam mutações nas regiões *rpoB* e *katG/inhA* que conferem resistência à rifampicina e isoniazida, respectivamente, são comercialmente utilizados (9).

O presente estudo tem como objetivo avaliar os níveis de resistência aos fármacos de primeira e segunda linha do *M. tuberculosis* MDR/XDR e sua relação com mutações nas regiões *rpoB*, *katG* e *inhA*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas bacterianas

Um total de 115 cepas de *M. tuberculosis*, estocadas em freezer a -70°C , provenientes de amostras clínicas pulmonares, identificadas como MDR ou XDR, correspondente a 97 pacientes foram identificadas no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Minas Gerais, região sudeste do Brasil, entre

2008 e 2011. A partir da coleção de cepas foi verificada a viabilidade bacteriana como critério de inclusão (10). Foram excluídas 73 cepas referentes a 55 pacientes.

O teste de sensibilidade aos fármacos para a detecção de cepas MDR ou XDR e a identificação foi realizado conforme protocolo (10,11,12). Foram selecionadas 42 cepas, sendo 39 MDR e 3 XDR. Das MDR, 14 eram resistentes à estreptomicina (STR), três à etambutol (EMB) e uma à ofloxacino (OFX). Das XDR, todas eram resistentes à STR, EMB, e OFX, enquanto duas resistentes à amicacina (AMK) e uma à capreomicina.

Foi analisado o MIC para isoniazida (INH), rifampicina (RIF), STR, EMB, AMK, levofloxacino (LVX), cicloserina (CIC) e rifabutina (RFB). A determinação do MIC e detecção das mutações foram realizadas de forma cega.

Foram incluídos no estudo 10 isolados clínicos sensíveis aos fármacos de primeira linha e uma cepa padrão de *M. tuberculosis* ATCC 27294 como controle.

Soluções de fármacos

Todos os fármacos foram obtidos de Sigma-Aldrich®. Soluções estoque de INH, STR, EMB, AMK e CIC foram preparadas em água destilada estéril. Solução estoque de LVX foi preparada em NaOH 0,1N. Soluções estoque de RIF e RFB foram preparadas em metanol (13). As soluções foram mantidas a -70 °C por até 6 meses. Soluções de uso foram preparadas a partir das soluções estoque e diluídas em água destilada estéril.

A faixa de concentração dos fármacos testados para MIC foi: INH (0,007 a 32 µg/mL), RIF (0,007 a 64 µg/mL), STR (0,06 a 64 µg/mL), EMB (0,12 a 64 µg/mL), AMK (0,06 a 32 µg/mL), LVX (0,03 a 64 µg/mL), RFB (0,007 a 16 µg/mL) e CIC (0,25 a 128 µg/mL).

Determinação do MIC

O MIC foi determinado por meio do sistema automatizado BACTEC[®] MGIT[®] 960 (BD Bioscience, Sparks, MD, USA) conforme recomendação do fabricante (14).

Tubos MGIT contendo meio Middlebrook 7H9 foram suplementados com 10% de OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase) contendo diferentes concentrações dos fármacos e um tubo sem fármaco foi utilizado como controle de crescimento.

Suspensão bacteriana foi preparada a partir de culturas de primeiro repique em meio LJ e incubadas a 36°C±1 (15). As colônias foram transferidas para tubo de vidro estéril contendo 3 mL de água destilada estéril e 5 pérolas de vidro. O sobrenadante da suspensão foi ressuspenso em outro tubo contendo água destilada estéril e ajustada a turbidez correspondente à escala padrão 0,5 de McFarland. Foi realizada diluição 1:5 para inóculo nos tubos contendo fármacos e diluição 1:100 nos tubos controle de crescimento (CC). Os tubos foram inoculados com 500 µL de suspensão bacteriana.

Um tubo com determinado fármaco foi considerado resistente para uma determinada concentração quando positivo até dois dias após a positividade do tubo CC. Um tubo contendo fármaco foi considerado sensível quando não positivo após dois dias da positividade do tubo CC (15).

O MIC para cada fármaco foi definido como a menor concentração em que a cepa foi considerada sensível (16).

Os pontos de corte de resistência estabelecidos para MIC foram: INH >0,25 µg/mL; RIF >1 µg/mL; STR >2 µg/mL; EMB >4 µg/mL; AMK >1 µg/mL; LVX >2 µg/mL; CIC >32 µg/mL e RFB >0,5 µg/mL (17). Cepas com MIC acima do ponto de corte foram definidas como resistentes, enquanto que MIC menor ou igual ao ponto de corte foram definidas como sensíveis.

Para facilitar a interpretação, os níveis de resistência dos referidos fármacos foram definidos arbitrariamente após cálculo das medianas e percentis 25 e 75 semelhante ao estudo de Jamieson *et al.*, 2014 (18). Os níveis de resistência foram classificados para as cepas com MIC acima do ponto de corte. Para INH foram definidos três níveis: baixo ($>0,25$ a ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$), moderado (4 $\mu\text{g/mL}$) e alto (≥ 8 $\mu\text{g/mL}$). Para RIF, STR, EMB, LVX, RFB dois níveis: RIF baixo (>1 a ≤ 16 $\mu\text{g/mL}$) e alto (≥ 32 $\mu\text{g/mL}$); STR baixo (>2 a ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$) e alto (≥ 8 $\mu\text{g/mL}$); EMB: baixo (>4 a ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$) e alto (≥ 16 $\mu\text{g/mL}$); LVX: baixo (>2 a ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$) e alto (≥ 8 $\mu\text{g/mL}$); RFB: baixo ($>0,5$ a ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$) e alto (≥ 8 $\mu\text{g/mL}$). Para AMK apenas alto nível (≥ 32 $\mu\text{g/mL}$).

Genotype MTBDRplus

Foram utilizadas 53 cepas do *M. tuberculosis* para detecção de mutações nas regiões *rpoB*, *katG* e *inhA* (42 MDR/XDR, 10 sensíveis e uma cepa de referência ATCC 27294) pelo ensaio Genotype MTBDRplus[®] (19) conforme recomendação do fabricante.

Análise estatística

Foi utilizado software SPSS versão 18 para cálculo estatístico com intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%.

As correlações dos valores do MIC entre RIF e RFB e entre STR e AMK foram realizadas pelo teste de correlação ρ de Spearman.

A associação entre os níveis de resistência e as mutações foi realizada por meio do teste Exato de Fisher.

RESULTADOS

Determinação do MIC

O MIC foi determinado para um total de 53 cepas de *M. tuberculosis*, sendo 39 MDR e três XDR, 10 sensíveis e uma ATCC de *M. tuberculosis*.

O MIC das 42 cepas MDR/XDR estão apresentados na Tabela 1 e os das cepas sensíveis na Tabela 2. Suas representações gráficas são apresentadas na Figura 1.

Na Figura 1, observam-se cepas MDR em que o MIC está abaixo ou no ponto de corte. Para duas cepas resistentes à INH, cinco à RIF, uma à STR e nove à RFB os resultados foram: 0,25 µg/mL, ≤1 µg/mL, 1 µg/mL e ≤ 0,5 µg/mL, respectivamente. Além disso, para uma XDR, o MIC de RFB foi 0,25 µg/mL e outra o de LVX 2 µg/mL.

Em relação aos níveis de resistência das cepas XDR observa-se que: das resistentes à INH, duas apresentaram baixo nível e uma moderado. Das resistentes à RIF e STR uma apresentou baixo nível e duas alto. Duas das resistentes à RFB apresentaram baixo nível. Três das resistentes ao EMB, duas das resistentes à AMK e duas à LVX apresentaram alto nível (Figura 1a, b, c, d, e, f).

Para CIC, todas as MDR/XDR apresentaram MIC <32 µg/mL (Figura 1g).

Entre as cepas sensíveis, todas apresentaram MIC igual ou abaixo do ponto de corte de resistência, exceto uma para LVX (MIC 4 µg/mL) (Figura 1).

Em 18 cepas com alto nível de resistência à RIF (MIC ≥64 µg/mL), 11 apresentaram alto nível para RFB (MIC ≥8 µg/mL), porém, as sete restantes apresentaram baixo nível.

Quatro cepas com baixo nível para RIF (>1µg/mL e ≤16 µg/mL) apresentaram MIC de RFB ≤0,5µg/mL.

TABELA 1 MIC de *M. tuberculosis* MDR/XDR ($\mu\text{g/mL}$).

Código	INH	RIF	STR	EMB	AMK	LVX	CIC ^b	RFB ^b
R1	4*	>64*	0,5	0,5	0,5	0,5	8	8
R3	16*	>64*	2	4	0,5	0,25	8	4
R4	16*	4*	>64*	4	1	0,5	8	0,12
R5	4*	2*	0,5	1	0,5	0,25	8	0,25
R6	4*	>64*	2	1	0,5	0,25	8	8
R9	2*	>64*	0,5	2	0,5	0,5	8	16
R10	4*	>64*	0,25	1	0,5	0,25	8	8
R11	8*	32*	0,5	1	1	0,25	8	0,12
R12	1*	>64*	0,5	1	0,25	0,5	8	4
R13 ^a	4*	64*	4*	32*	1	8*	16	4
R14	4*	>64*	0,5	4	1	0,25	8	8
R15	0,25*	$\leq 0,25^*$	4*	2	0,5	0,25	8	0,06
R18	32*	>64*	1*	4	0,5	0,25	8	4
R19	2*	>64*	2	2	1	0,5	8	8
R20	4*	>64*	2	2	1	4*	8	4
R24	2*	>64*	4*	0,5	0,5	0,25	8	≥ 16
R25	2*	8*	16*	16*	>32*	8*	8	0,25
R27	0,25*	>64*	0,5	16*	0,5	0,25	8	≥ 16
R30	4*	8*	64*	4	1	0,25	4	$\leq 0,12$
R31	16*	16*	4*	2	1	0,25	8	0,5
R32	2*	>64*	>64*	1	0,5	0,25	-	-
R33	4*	>64*	16*	2	1	0,25	8	-
R34	16*	>64*	8*	4	1	0,25	8	≥ 16
R38	2*	>64*	0,5	1	1	0,5	-	-
R40	0,5*	0,5*	16*	4	1	0,25	8	-
R43	2*	64*	4*	1	1	0,25	-	-
R46	16*	>64*	16*	1	1	0,25	4	≥ 16
R48	2*	>64*	8*	0,5	1	0,25	-	-
R53	16*	>64*	2	4	0,5	4	8	≥ 16
R57	2*	>64*	16*	0,5	1	0,25	-	-
R59	2*	>64*	16*	16*	>32*	2*	8	4
R60	4*	>64*	0,5	4	0,5	0,5	-	-
R61	4*	>64*	0,25	2	0,5	0,25	-	-
R62	4*	64*	2	4	1	0,25	-	-
R63	2*	$\leq 0,25^*$	0,5	8*	0,5	0,25	8	$\leq 0,12$
R65	16*	1*	0,5	1	0,5	0,25	8	$\leq 0,12$
R66	2*	0,5*	0,25	0,5	0,25	0,25	8	$\leq 0,12$
R67	2*	>64*	0,25	2	0,5	0,25	8	4
R68	>32*	>64*	0,25	4	0,5	0,25	-	-
R69	>32*	>64*	0,5	8*	0,5	0,25	8	-
R71	4*	>64*	0,5	4	0,5	0,25	-	-
R72	2*	>64*	0,5	1	1	1	8	-

*Cepas resistentes; ^aXDR resistente à capreomicina 2,5 $\mu\text{g/mL}$; ^bNão foi testada a sensibilidade à concentração crítica. INH: isoniazida; RIF: rifampicina; STR: estreptomicina; EMB: etambutol; AMK: amicacina; LVX: levofloxacino; CIC: cicloserina; RFB: rifabutin.

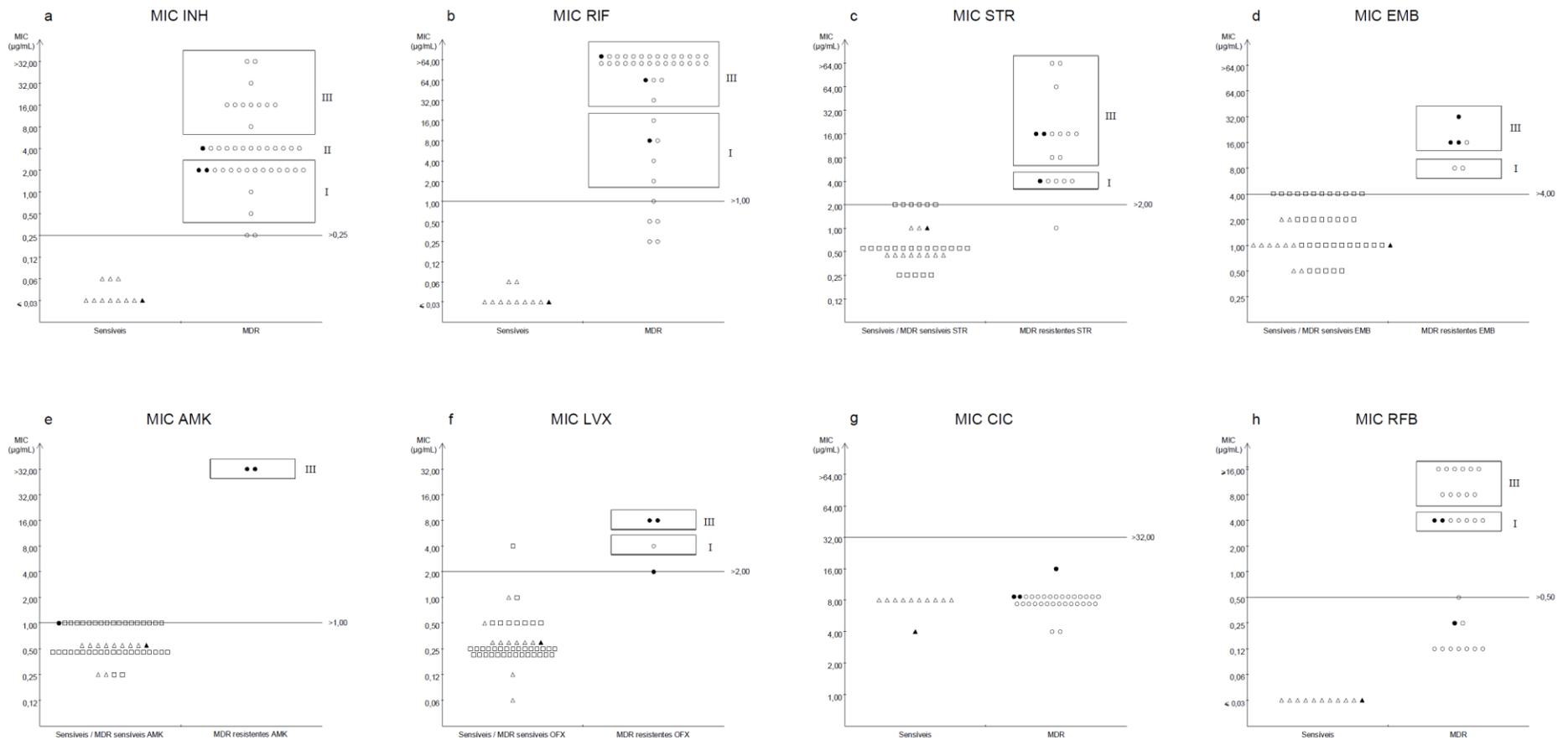


FIGURA 1 Diagrama de pontos de MIC de fármacos de primeira e segunda linha de *M. tuberculosis* MDR/XDR e sensíveis.

○ MDR; ● XDR; △ Sensíveis; □ MDR sensível ao respectivo fármaco; ▲ *M. tuberculosis* ATCC 27294; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; STR: estreptomicina; EMB: etambutol; AMK: amicacina; LVX: levofloxacino; OFX: ofloxacino; CIC: cicloserina; RFB: rifabutina. Níveis de resistência I: baixo; II: moderado; III: alto. MIC STR *M. tuberculosis* ATCC 27294 $\leq 1,0$ µg/mL; Gráfico b: o valor 0,25 representa MIC $\leq 0,25$ µg/mL; Gráfico h: o valor 0,12 representa MIC $\leq 0,12$ µg/mL.

TABELA 2 MIC de *M. tuberculosis* sensíveis ($\mu\text{g/mL}$).

Código	INH	RIF	STR	EMB	AMK	LVX	CIC ^b	RFB ^b
S1	0,015	0,03	0,5	0,5	0,25	0,12	8	<0,015
S2	0,015	0,015	0,5	1	0,25	0,06	8	<0,015
S3	0,03	0,015	0,5	1	0,5	0,25	8	0,03
S4	0,06	0,03	0,5	1	0,5	0,25	8	0,03
S5	0,06	0,03	0,5	1	0,5	1	8	0,015
S6	0,03	0,015	0,5	1	0,5	0,25	8	0,03
S7	0,03	0,03	0,5	0,5	0,5	0,25	8	0,03
S8	0,03	0,06	1	2	0,5	0,5	8	0,03
S9	0,06	0,06	1	1	0,5	0,25	8	0,015
S10	0,03	0,03	0,5	2	0,5	0,25	8	0,03
ATCC	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	≤ 1	1	0,5	0,25	4	$\leq 0,03$

^bNão foi testada a sensibilidade à concentração crítica. INH: isoniazida; RIF: rifampicina; STR: estreptomicina; EMB: etambutol; AMK: amicacina; LVX: levofloxacino; CIC: cicloserina; RFB: rifabutina. ATCC: *M. tuberculosis* ATCC 27294.

Nove cepas com alto nível de resistência à STR e cinco com baixo nível (inclusive uma XDR) apresentaram MIC de AMK abaixo do ponto de corte. Duas XDR apresentaram alto nível de resistência à STR (MIC 16 $\mu\text{g/mL}$) e também à AMK (MIC >32 $\mu\text{g/mL}$).

Os níveis de resistência das cepas de *M. tuberculosis* MDR/XDR estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3 Níveis de resistência de *M. tuberculosis* MDR/XDR.

Fármaco	Níveis de resistência		
	Baixo	Moderado	Alto
INH	16/40 (40%)	13/40 (32,5%)	11/40 (27,5%)
RIF	5/37 (13,5%)	-	32/37 (86,5%)
STR	5/16 (31,2%)	-	11/16 (68,8%)
EMB	2/6 (33,3%)	-	4/6 (66,7%)
AMK	-	-	2/2 (100,0%)
LVX	1/3 (33,3%)	-	2/3 (66,7%)
RFB	7/18 (38,9%)	-	11/18 (61,1%)

INH: isoniazida; RIF: rifampicina; STR: estreptomicina; EMB: etambutol; AMK: amicacina; LVX: levofloxacino; RFB: rifabutina.

Correlação entre os valores de MIC de RIF e RFB

A correlação entre os valores de MIC de RIF e RFB foi significativa ($p < 0,001$), com coeficiente de correlação de 0,85, indicando forte correlação entre os valores.

Correlação entre os valores de MIC de STR e AMK

A correlação entre os valores de MIC de STR e AMK foi significativa ($p < 0,001$), com coeficiente de correlação de 0,61, indicando moderada correlação entre os valores.

Genotype MTBDRplus®.

As tabelas 4 e 5 demonstram as mutações nas regiões *rpoB* e *katG/inhA* e as relações com os níveis de resistência de 40 cepas do *M. tuberculosis* MDR/XDR, respectivamente. O resultado foi indeterminado em duas cepas. Não foram detectadas mutações nas dez cepas sensíveis e na cepa de referência ATCC.

TABELA 4 Mutações na região *rpoB* relacionadas aos níveis de resistência à RIF.

Mutação <i>rpoB</i>	Percentual (n)	Nível de resistência
S531L	35% (14/40)	92,8% alto
H526D	17,5% (7/40)	100% alto
D516V	15% (6/40)	83,3% baixo
H526Y	7,5% (3/40)	100% alto
D516V e H526D	2,5% (1/40)	100% alto
Sem mutação ^a	22,5% (9/40)	44,4% baixo

^a 8/9 (88,9%) resistente; 1/9 (11,1%) sensível.

TABELA 5 Mutações na região *katG/inhA* relacionadas aos níveis de resistência à INH.

Mutação <i>katG</i>	Mutação <i>inhA</i>	Percentual (n)	Nível de resistência
S315T	Sem mutação	60,0% (24/40)	baixo a alto ^b
S315T	C15T	17,5% (7/40)	100% alto
Sem mutação	C15T	5,0% (2/40)	100% baixo
Sem mutação ^a	Sem mutação ^a	17,5% (7/40)	42,8% baixo

^a 2/7 (28,6%) resistente; 5/7 (71,4%) sensível. ^bbaixo (45,8%), moderado (50%) e alto (4,2%).

Observa-se que para INH, as cepas com mutação S315T *katG* foram relacionadas à um fenótipo de heterogeneidade de níveis de resistência (baixo a alto), com MIC 1–8 µg/mL (Tabela 5).

Associação entre as mutações e os níveis de resistência

Em relação às mutações na região *rpoB* e os níveis de resistência à RIF, a mutação D516V foi associada à baixo nível. Essa mutação também foi associada às cepas sensíveis à RFB.

A mutação S531L do *rpoB* foi associada à baixo nível de resistência à RFB enquanto que a mutação H526Y foi associada à alto nível.

Em relação às mutações em *katG* e *inhA*, a mutação S315T *katG* foi associada à moderado nível de resistência à INH, enquanto que mutações simultâneas S315T *katG* e C15T *inhA* foram associadas à alto nível.

DISCUSSÃO

Com o aumento global de TB MDR e XDR (1), há uma necessidade crescente de determinar os níveis de resistência aos fármacos de primeira e segunda linha do tratamento da TB com precisão (3). O tratamento de pacientes com TB resistente aos fármacos deve ser baseado em

medidas quantitativas de teste de sensibilidade, para a prevenção do aumento do número de casos de TB com cepas resistentes e maximização no uso dos fármacos disponíveis, resultando em um melhor manejo e controle da doença (3).

O laboratório desempenha um papel crítico na identificação de casos de TB MDR e XDR, no entanto, como resultado de negligência histórica, poucos programas nacionais de controle da TB têm capacidade para a realização de TS aos fármacos de primeira linha e muito menos para testar resistência aos fármacos de segunda linha (20).

Embora o TS à concentração crítica seja útil para a identificação de casos de TB com cepas resistentes aos fármacos, esse deve ser complementado por avaliação quantitativa da resistência, em particular para os fármacos para os quais a heterogeneidade na resistência fenotípica está frequentemente presente (16).

Este trabalho é importante considerando que no Brasil não há estudos que descrevem os níveis de resistência de cepas MDR e XDR para os principais fármacos dos esquemas terapêuticos padronizados no Brasil.

O MIC, que representa a menor concentração que inibe o crescimento bacteriano *in vitro*, pode indicar os níveis de resistência aos fármacos (3). Os diferentes níveis de resistência têm importantes implicações biológicas, sendo concebível que o baixo nível de resistência, eventualmente, não corresponda à resistência clínica. Inversamente, na presença de um fenótipo de alto nível, o uso de determinado fármaco seja de pouco, ou nenhum benefício clínico. As implicações clínicas do nível moderado estão menos elucidadas (3). Essa pode ser uma das razões pela qual mais de um terço do tratamento dos casos de TB MDR em tratamento padrão tem sido eficaz (21,22). Adicionalmente, quando o nível de resistência é baixo para INH, pode ser considerado tratamento com esse fármaco (23,24).

Neste estudo, o MIC de INH foi considerado, respectivamente, baixo e moderado para 40% e 32,5% das cepas MDR/XDR e de RIF baixo para 13,5%, bem como algumas cepas resistentes

à STR e/ou ao EMB que apresentaram baixo nível de resistência. Das cepas MDR que eram sensíveis à STR, EMB e AMK, os seus respectivos MIC estavam abaixo do ponto de corte (Tabela 1 e 3 e Figura 1). Na maioria dos casos quando se tem um MIC alto observa-se uma diminuição da efetividade da terapêutica, porém quando o MIC é baixo ou mesmo moderado, os pacientes podem ter benefício clínico (24).

Além disso, como demonstrado neste trabalho com INH, RIF, STR e LVX, cepas resistentes à concentração crítica e que apresentaram MIC abaixo ou no ponto de corte, podem ser justificadas pela heterorresistência fenotípica (25).

Em nosso trabalho, duas cepas XDR apresentaram resistência à OFX com alto nível de resistência à LVX. Nessas situações, pode-se utilizar outras fluorquinolonas tais como, moxifloxacino ou gatifloxacino (26,27).

Ressalta-se o resultado do MIC da CIC (todas as cepas sensíveis), pois esse pode ser utilizado em associação a outros fármacos com boa perspectiva de sucesso para os pacientes MDR e XDR. Como no Brasil o fármaco preconizado em substituição à cicloserina é a terizidona, esta poderia ser prescrita (28).

Os pacientes com TB que albergam cepas com baixo nível de resistência à RIF ainda podem se beneficiarem com a utilização desse fármaco em altas doses (29).

Todas as cepas com baixo nível de resistência à RIF apresentaram MIC para RFB abaixo do ponto de corte de resistência, inclusive uma XDR, o que pode ser uma opção para pacientes com TB/HIV que tem contra indicação ao uso da RIF (30,31,32). Também foram observadas sete cepas que apresentaram alto nível de resistência para RIF e baixo para RFB, sendo que este poderia ser indicado para o tratamento de TB MDR e XDR (31,33).

Em relação à STR e AMK, algumas cepas com alto nível de resistência à STR apresentaram-se sensíveis à AMK, demonstrando mais uma vez que, em pacientes com pouca opção terapêutica, um esquema com AMK pode ser uma alternativa (30).

A cepa XDR resistente à capreomicina e sensível à AMK apresentou MIC de AMK no ponto de corte de resistência, podendo ser uma alternativa no tratamento do paciente com esta cepa. Segundo dados de Jugheli *et al.*(2009), quatro cepas de *M. tuberculosis* apresentaram alto nível de resistência à capreomicina mas sensíveis à AMK (34).

Em nosso trabalho, como descrito por outros autores, a maioria das mutações S531L, H526D ou H526Y em *rpoB* estavam relacionadas à alto nível de resistência à RIF (18). O mesmo pode ser observado com as mutações em *katG* e *inhA* onde as mutações S315T *katG* e ambas S315T *katG* e C15T *inhA* tiveram alto nível de resistência à INH (16,24).

A mutação D516V associada à baixo nível RIF concorda com Schön *et al.* (2013) (32) embora alguns autores relataram associação à moderado nível à RIF (18). As cepas sensíveis à RFB associadas a essa mutação foi semelhante aos resultados encontrados por esses autores (18,32).

A mutação S531L *rpoB* associada à baixo nível de resistência à RFB encontrada em nosso estudo foi divergente ao estudo de Jamieson *et al.* (2014) que relataram essa mutação associada à alto nível (18). Porém, a mutação H526Y *rpoB* associada à alto nível de resistência concorda com o mesmo estudo (18).

A mutação S315T *katG* associada à moderado nível de resistência à INH concorda parcialmente com alguns autores que relatam a mutação associada a nível de moderado a alto (24). A mutação simultânea S315T *katG* e C15T *inhA* associadas à alto nível de resistência à INH concorda com os dados de outros trabalhos (16,24).

Apesar de algumas divergências dos resultados em relação a outros estudos, isso demonstra a heterogeneidade das cepas circulantes no mundo.

O estudo tem como limitação a não avaliação do desfecho dos pacientes utilizando os fármacos que apresentaram baixo a moderado níveis de resistência, de forma a compreender se eles apresentariam sucesso com o tratamento instituído, o baixo número de cepas

resistentes à alguns fármacos, a falta de estudo genotípico das cepas e sequenciamento de outras mutações relacionadas à resistência.

CONCLUSÃO.

O conhecimento dos níveis de resistência de *M. tuberculosis* MDR/XDR e as análises das relações com a detecção das mutações podem oferecer subsídios importantes para personalizar o tratamento desses pacientes.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho dos experimentos: AG e SM. Realização dos experimentos: AG. Fornecimento de cepas do estudo: CA. Análise dos dados: AG e SM. Elaboração do artigo: AG e SM. Revisão do artigo: CA, PA e WC. Produção da versão final do artigo: AG, SM, CA, PA e WC. Promoção do financiamento do estudo: SM. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado financeiramente pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Agradecemos à Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), ao Grupo de Pesquisa em Micobacterioses da Faculdade de Medicina/UFMG e à Fundação Ezequiel Dias.

REFERÊNCIAS

1. **World Health Organization.** 2014. Global tuberculosis report 2014. WHO/HTM/TB/2014.08. World Health Organization, Geneva: Switzerland.
2. **World Health Organization.** 2010. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3. Geneva: Switzerland.
3. **Böttger, EC.** The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing. 2011. Clin. Microbiol. Infect. **17**(8):1128–1134. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03551.x>.
4. **Ramaswamy S, Musser JM.** 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. Tuber. Lung Dis. **79**:3–29. <http://dx.doi.org/10.1054/tuld.1998.0002>.
5. **Yang B, Koga H, Ohno H, Ogawa K, Fukuda M, Hirakata Y, Maesaki S, Tomono K, Tashiro T, Kohno S.** 1998. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Antimicrob. Chemother. **42**:621–628. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/42.5.621>.
6. **Schön T, Jurén P, Chryssanthou E, Giske CG, Kahlmeter G, Hoffner S, Angeby K.** 2013. Rifampicin-resistant and rifabutin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains:

- a breakpoint artefact? *J. Antimicrob. Chemother.* **68**:2074–2077.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt150>.
7. **Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, Jasperse L, Pan X, Wanger A, Quitugua T, Graviss EA.** 2003. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **47**:1241-50.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.4.1241-1250.2003>.
 8. **Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P; Cecon L, Forestiero F, Leite CQF, Sato DN, Shikama ML, Mamaizuka EM, Hirata RDC, Hirata MH.** 2004. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **48**:3373-381.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.9.3373-3381.2004>.
 9. **Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Richter E.** 2007. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **45**(8):2635–2640.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00521-07>.
 10. **Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica.** 2008. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias. Brasília: Ministério da Saúde. 436 p.
 11. **World Health Organization.** 2008. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. WHO/HTM/TB/2008.392. Geneva: **WHO**.

12. **Leão SC, Martin A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo J, Telles MAS, Portaels F.** 2004. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Brugges, Vanden Broelle, 164 p.
13. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2011. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes; Approved Standard – Second Edition. CLSI document M24-A2. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI, **31**(5).
14. **Siddiqi SH, Rüsç-Gerdes S.** 2006. MGIT Procedure manual for BACTEC® MGIT® 960 TB system. Foundation for Innovative New Diagnostics. Becton Dickinson, Sparks, MD, USA.
15. **Ådjers-Koskela K, Katila, M.** 2003. Susceptibility testing with the manual mycobacteria growth indicator tube (MGIT) and the MGIT 960 system provides rapid and reliable verification of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **41**(3):1235-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.3.1235-1239.2003>.
16. **Springer B, Lucke K, Calligaaris-Maibach R, Ritter C, Böttger EC.** 2009. Quantitative Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by Use of MGIT 960 and EpiCenter Instrumentation. *J. Clin. Microbiol.* **47**(6):1773. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02501-08>.

17. **Mpagama SG, Houpt ER, Stroup S, Kumburu H, Gratz J, Kibiki GS, Heysell, SK.** 2013. Application of quantitative second-line drug susceptibility testing at a multidrug-resistant tuberculosis hospital in Tanzania. *BMC Infect. Dis.* **13**:432. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-432>.
18. **Jamieson FB, Guthrie JL, Neemuchwala A, Lastovetska O, Melano RG, Mehaffy C.** 2014. Profiling of *rpoB* mutations and MICs for rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **52**(6):2157-2162. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00691-14>.
19. **Miotto P, Piana F, Cirillo DM, Migliori GB.** 2008. Genotype MTBDRplus: a further step toward rapid identification of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **46**:393–394. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01066-07>.
20. **Médicins Sans Frontières.** 2014. Out of Step. Deadly implementation gaps in the TB response. A survey of TB diagnostic and treatment practices in eight countries. Geneva: MSF, 2014. <http://www.msfaccess.org/about-us/media-room/press-releases/msf-sounds-alarm-practices-and-policies-dangerously-out-step-what>.
21. **Espinal MA, Kim SI, Suarez G, Kam KM, Khomenko AG, Migliori GB, Baéz J, Kochi A, Dye C, Ravigione MC.** 2000. Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: treatment outcomes in 6 countries. *JAMA.* **283**:2537–2545. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.283.19.2537>.

22. **Böttger EC.** Drug-resistant tuberculosis. 2001. *Lancet*. **357**:1288–1289.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04427-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04427-5).
23. **World Health Organization. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease.** 2008. Global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: fourth global report. WHO/HTM/TB/2008.394. Geneva: Switzerland.
24. **Springer B, Calligaris-Maibach RC, Ritter C, Böttger EC.** 2008. Tuberculosis drug resistance in an area of low endemicity in 2004 to 2006: semiquantitative drug susceptibility testing and genotyping. *J. Clin. Microbiol.* **46**(12):4064-4067.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01114-08>.
25. **Rinder H, Mieskes KT, Löscher T.** 2001. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* *Int J Tuberc Lung Dis.* **5**(4):339-345.
26. **Böttger EC.** Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: molecular mechanisms and laboratory susceptibility testing. 2011. In: DONALD, P.R.; VAN HELDEN, P.D. (Ed.). *Antituberculosis Chemotherapy. Progress in Respiratory Research.* Basel: Karger. **40**:128–144.
27. **Von Groll A, Martin A, Jureen P, Hoffner S, Vandamme P, Portaels F, Palomino JC, da Silva PA.** 2009. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in *gyrA* and *gyrB*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**(10):4498–4500.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00287-09>.

28. **Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica.** 2011. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 284 p.
29. **Van Ingen J, Aarnoutse R, de Vries G, Boerre MJ, van Soolingen D.** 2011. Low-level rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains raise a new therapeutic challenge Int J Tuberc Lung Dis. **15**(7):990–992. <http://dx.doi:10.5588/ijtld.10.0127>.
30. **World Health Organization.** 2010. Treatment of tuberculosis: guidelines – 4th ed. WHO/HTM/TB/2009.420. Geneva: Switzerland
31. **Sirgel FA, Warren RM, Böttger EC, Klopper M, Victor TC, van Helden PD.** 2013. The rationale for using rifabutin in the treatment of MDR and XDR tuberculosis outbreaks. PLoS One. **8**(3):e59414. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059414>.
32. **Schön T, Juréen P, Chryssanthou E, Giske CG, Kahlmeter G, Hoffner S, Angeby K.** 2013. Rifampicin-resistant and rifabutin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains: a breakpoint artefact? J. Antimicrob. Chemother. **68**:2074–2077. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt150>.
33. **Lee SS, Meintjes G, Kamarulzaman A, Leung CC.** 2013. Management of tuberculosis and latent tuberculosis infection in human immunodeficiency virus-infected persons. Respirology **18**:912–922. <http://dx.doi.org/10.1111/resp.12120>.

34. **Jugheli L, Bzekalava N, de Rijk P, Fissette K, Portaels F, Rigouts L.** 2009. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**(12):5064–5068. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00851-09>.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização de MIC em BACTEC® MGIT® 960 demonstrou ser uma técnica trabalhosa. Além de ser uma técnica complexa, exige infraestrutura sofisticada de laboratório, o que pode limitar seu uso em muitos locais com poucos recursos.

Ressalta-se a importância do nível de biossegurança 3 exigido para a manipulação de cepas MDR e XDR, e de profissionais qualificados.

Foi calculada a correlação entre os valores de MIC e resistência primária/adquirida. Dentre as 42 cepas MDR/XDR, os dados de resistência primária ou adquirida estavam disponíveis para 36 cepas, sendo 30 adquirida e seis primária. Não foi possível recuperar a informação de tratamento prévio para seis cepas. A correlação foi significativa apenas para o fármaco CIC ($p=0,047$). O coeficiente de correlação foi 0,38, apresentando correlação fraca. Apesar disso, todos os MIC de CIC apresentaram-se abaixo do ponto de corte (sensível).

A sensibilidade do Genotype MTBDRplus® para INH e RIF foi de 87,5% e 97,5%, especificidade 100% e 100% , VPP 100% e 100%, VPN 68,8% e 91,7%, acurácia 90,2% e 98,0% e concordância 0,75 (boa) e 0,94 (muito boa), respectivamente, semelhante ao demonstrado por outros autores.^{44,59}

⁵⁹MIOTTO, P.; PIANA, F.; PENATI, V.; CANDUCCI, F.; MIGLIORI, G.B.; CIRILLO, D.M. Use of Genotype MTBDR Assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. **J Clin Microbiol**, v. 44(7), p. 2485–2491, 2006.

6 PERSPECTIVAS

Novas metodologias mais simples estão sendo desenvolvidas com a intenção de atender à necessidade de realizar os testes de maneira prática e efetiva.⁶⁰ A realização de metodologias em microplacas para a determinação do MIC de casos de MDR e XDR tem como alternativa a utilização do método MODS do inglês *Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay*, que utiliza observação de crescimento bacteriano por microscópio de luz invertida para examinar placas de 24 poços inoculadas com meio líquido Middlebrook 7H9 suplementado, solução de fármaco e suspensão bacteriana.^{53,61,62,63,64,65,66}

Outra possibilidade seria os métodos colorimétricos, que baseados na capacidade de bactérias vivas em reduzir um indicador e produzir uma mudança de cor visual, podem ser técnicas promissoras. A utilização de microplacas com indicadores de oxido-redução, como os sais de resazurina (REMA)^{67,68} e de tetrazolium (MTT)^{25,68,69} são uma alternativa para melhor visualização da leitura desses testes.

⁶⁰WORLD HEALTH ORGANIZATION. Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis: policy statement. WHO/HTM/TB/2011.9. Geneva: WHO, 2011b.

⁶¹CAVIEDES, L.; LEE T.; GILMAN, R.H.; SHEEN, P.; SPELLMAN, E.; LEE, E.H.; BERG, D.E.; MONTENEGRO-JAMES, S. and THE TUBERCULOSIS WORKING GROUP IN PERU. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. **J Clin Microbiol.** v. 38, p. 1203–1208, 2000.

⁶²MENGATTO, L.; CHIARI, Y.; IMAZ, M.S. Evaluation of rapid alternative methods for drug susceptibility testing in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 101(5), p. 535-542, 2006.

⁶³EJIGU, G.S.; WOLDEAMANUEL, Y.; SHAH, N.S.; GEBYEHEU, M.; SELASSIE, A.; LEMMA, E. Microscopic-observation drug susceptibility assay provides rapid and reliable identification of MDR-TB **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 12(3), p. 332–337, 2008.

⁶⁴RASSLAN, O.; HAFEZ, S.F.; HASHEM, M.; AHMED, O.I.; FARAMAWY, M.A.S.; KHATER, W.S.; SALEH, D.A.; MOHAMED, M.I.; KHALIFA, M.A.M.; SHOUKRY, F.A. EL-MOGHAZY, E.H. Microscopic observation drug susceptibility assay in the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 16(7), p. 941–946, 2012.

⁶⁵TROLLIP, A.P.; MOORE, D.; CORONEL, J.; CAVIEDES, L.; KLAGES, S.; VICTOR, T.; ROMANCENCO, E.; CRUDU, V.; AJBANI, K.; VINEET, V.P.; RODRIGUES, C.; JACKSON, R.L.; EISENACH, K.; GARFEIN, R.S.; RODWELL, T.C.; DESMOND, E.; GROESSL, E. J.; GANIATS, T.G.; CATANZARO, A. Second-line drug susceptibility breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis* using the MODS assay. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 18(2), p. 227–232, 2014.

⁶⁶KAM, K.M. Microscopic observation drug susceptibility (MODS): where are we going? **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 18(2), p. 127, 2014.

⁶⁷MARTIN, A.; CAMACHO, M.; POERTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 47, p. 3616–3619, 2003.

⁶⁸MARTIN, A.; MORCILLO, N.; LEMUS, D.; MONTORO, E.; DA SIVA TELLES, M.A.; SIMBOLI, N. PONTINO, M.; PORRAS, T.; LÉON, C.; VELASCO, M.; CHACON, L.; BARRERA, L.; RITACCO, V.;

Essa pesquisa levanta a necessidade de mais estudos sobre os níveis de resistência em *M. tuberculosis* no estado de Minas Gerais, principalmente voltados à clínica médica e desfechos de tratamento.

Além disso, estudos futuros por genotipagem podem avaliar outras mutações em genes de resistência do *M. tuberculosis* com os níveis de resistência em cepas circulantes em Minas Gerais.

PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 9(8), p. 901–906, 2005.

⁶⁹CAVIEDES, L.; DELGADO, J.; GILMAN, R.H. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** v. 40, p. 1873–1874, 2002.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÅDJERS-KOSKELA, K.; KATILA, M. Susceptibility testing with the manual mycobacteria growth indicator tube (MGIT) and the MGIT 960 system provides rapid and reliable verification of multidrug-resistant tuberculosis. **J Clin Microbiol.** v. 41(3), p. 1235-1239, 2003.

ARBEX, M.A.; VARELLA, M.C.L.; DE SIQUEIRA, H.R.; DE MELLO, F.A.F. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs. **J Bras Pneumol.** v. 36(5), p. 641-656, 2010.

AUGUSTO, C.J.; CARVALHO, W.S.; GONÇALVES, A.D.; CECCATO, M.G.B.; MIRANDA, S.S. Characteristics of tuberculosis in the state of Minas Gerais, Brazil: 2002-2009. **J Bras Pneumol.** v. 39(3), p. 357-364, 2013.

BEMER, P.; PALICOVA, F.; RÜSCH-GERDES, R.; DRUGEON, H.B.; PFYFFER, G.E. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC mycobacteria growth indicator tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** v. 40, p. 150-154, 2002.

BÖTTGER, E.C. Drug-resistant tuberculosis. **Lancet.** v. 357, p. 1288-1289, 2001.

BÖTTGER, E.C. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing. **Clin Microbiol Infect.** v. 17(8), p. 1128-1134, 2011.

BÖTTGER, E.C.; SPRINGER, B. Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. **Eur J Pediatr.** v. 167, p. 141-148, 2008.

BRAGA, J.U.; BARRETO, A.M.W.; HIJJAR, M.A. Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil 1995-97. Parte III: Principais resultados. **Boletim de Pneumologia Sanitária.** v. 11(1), p. 76-81, 2003.

BRAILE, D.M.; GODOY, M.F. **Cálculos Estatísticos Básicos para Testes Diagnósticos**, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 436 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011a. 284 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: **Relatório de situação: Minas Gerais**. 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Série histórica da taxa de incidência de tuberculose. Brasil, regiões e unidades federadas de residência por ano de diagnóstico (1990 a 2011)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Série histórica de casos novos de tuberculose. Brasil, regiões e unidades federadas de residência por ano de diagnóstico (1990 a 2011)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Esquemas individualizados para tratamento da tuberculose drogarresistente**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Boletim epidemiológico. **O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios**. v. 44(2). Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 13 p.

CANETTI, G.; FROMAN, S.; GROSSET, J.; HAUDUROY, P.; LANGEROVÁ, M.; MAHLER, H.T.; MEISSNER, G.; MITCHISON, D.A.; SULA, L. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. **Bull World Health Organ**. v. 29, p. 565–578, 1963.

CARDOSO, R.F.; COOKSEY, R.C.; MORLOCK, G.P.; BARCO, P.; CECON, L.; FORESTIERO, F.; LEITE, C.Q.F.; SATO, D.N.; SHIKAMA, M.L.; MAMIZUKA, E.M.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v.48, p. 3373-381, 2004.

CAVIEDES, L.; LEE T.; GILMAN, R.H.; SHEEN, P.; SPELLMAN, E.; LEE, E.H.; BERG, D.E.; MONTENEGRO-JAMES, S. and THE TUBERCULOSIS WORKING GROUP IN PERU. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium*

tuberculosis in sputum by microscopic observation of broth cultures. **J Clin Microbiol.** v. 38, p. 1203–1208, 2000.

CAVIEDES, L.; DELGADO, J.; GILMAN, R.H. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** v. 40, p. 1873–1874, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs - Worldwide, 2000–2004. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** v. 55, p. 301–305, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes; Approved Standard – Second Edition. CLSI document M24-A2. Wayne, Pennsylvania: **Clinical and Laboratory Standards Institute.** v. 31(5), 2011. 14 p.

DEVASIA, R.A.; BLACKMAN, A.; MAY, C.; EDEN, S.; SMITH, T.; HOOPER, N.; MARURI, F.; STRATTON, C.; SHINTANI, A.; STERLING, T.R. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: an assessment of MGIT 960, MODS and nitrate reductase assay and fluoroquinolone cross-resistance. **J Antimicrob Chemother.** v. 63, p. 1173–1178, 2009.

EJIGU, G.S.; WOLDEAMANUEL, Y.; SHAH, N.S.; GEBYEHU, M.; SELASSIE, A.; LEMMA, E. Microscopic-observation drug susceptibility assay provides rapid and reliable identification of MDR-TB **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 12(3), p. 332–337, 2008.

ESPINAL, M.A.; KIM, S.I.; SUAREZ, G.; KAM, K.M.; KHOMENKO, A.G.; MIGLIORI, G.B.; BAE'Z, J.; KOCHI, A.; DYE, C.; RAVLIGIONE, M.C. Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: treatment outcomes in 6 countries. **JAMA.** v. 283, p. 2537–2545, 2000.

GANDHI, N. R.; MOLL, A.; STURM, A.W.; PAWINSKI, R.; GOVENDER, T.; LALLOO, U.; ZELLER, K.; ANDREWS, J.; FRIEDLAND, G. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa **Lancet.** v. 368, 1575–80, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Demográfico de 2010.** Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010.

JAIN, A.; MONDAL, R. Extensively drug-resistant tuberculosis: current challenges and threats. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 53(2), p. 145-150, 2008.

JAMIESON, F.B.; GUTHRIE, J.L.; NEEMUCHWALA, A.; LASTOVETSKA, O.; MELANO, R.G.; MEHAFFY, C. Profiling of *rpoB* mutations and MICs for rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** v. 52(6), p. 2157-2162, 2014.

KAM, K.M. Microscopic observation drug susceptibility (MODS): where are we going? **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 18(2), p. 127, 2014.

KHANNA, A.; RAJ, V.S.; TARAI, B.; SOOD, R.; PAREEK, P.K.; UPADHYAY, D.J.; SHARMA, P.; RATTAN, A.; SAINI, K.S.; SINGH, H. Emergence and molecular characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the Delhi Region in India. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 54(11), p. 4789-4793, 2010.

KRÜÜNER, A.; YATES, M.D.; DROBNIIEWSKI, F.A. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial susceptibility testing and determination of critical concentration of first- and second-line antimicrobial drugs with clinical drugresistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** v. 44, p. 811–818, 2006.

LAWN, S.D.; ZUMLA, A.I. Tuberculosis. **Lancet.** v. 378, p. 57–72, 2011.

LEÃO, S.C.; MARTIN, A.; MEJIA G.I.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M.A.S.; PORTAELS, F. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria.** Printed by Vanden Broelle, Brugges, Belgium, 2004.164 p.

LIN, S.Y.; DESMOND, E.; BONATO, D.; GROSS, W.; SIDDIQI, S. Multicenter evaluation of Bactec MGIT 960 system for second-line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J Clin Microbiol.**v. 47 (11), p. 3630-3634, 2009.

MARSILI, L.; PASQUALUCCI, C.R.; VIGEVANI, A.; GIOIA, B.; SCHIOPPACASSI, G.; ORONZO, G. New rifamycins modified at positions 3 and 4. Synthesis, structure and biological evaluation. **J Antibiot.** v. 34, p. 1033–1038, 1981.

MARTIN, A.; CAMACHO, M.; POERTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 47, p. 3616–3619, 2003.

MARTIN, A.;MORCILLO, N.; LEMUS, D.; MONTORO, E.; DA SIVA TELLES, M.A.; SIMBOLI, N. PONTINO, M.; PORRAS, T.; LÉON, C.; VELASCO, M.; CHACON, L.;

- BARRERA, L.; RITACCO, V.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 9(8), p. 901–906, 2005.
- MATTEELLI, A.; ROGGI, A.; CARVALHO, A.C. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management. **Clin Epidemiol.** v. 6, p. 111-118, 2014.
- MÉDICINS SANS FRONTIÈRES. Out of Step. Deadly implementation gaps in the TB response. A survey of TB diagnostic and treatment practices in eight countries. Geneva: **MSF**, 2014.
- MENGATTO, L.; CHIANI, Y.; IMAZ, M.S. Evaluation of rapid alternative methods for drug susceptibility testing in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 101(5), p. 535-542, 2006.
- MIOTTO, P.; PIANA, F.; PENATI, V.; CANDUCCI, F.; MIGLIORI, G.B.; CIRILLO, D.M. Use of Genotype MTBDR Assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. **J Clin Microbiol.** v. 44(7), p. 2485–2491, 2006.
- MIOTTO, P.; PIANA, F.; CIRILLO, D.M.; MIGLIORI, G.B. Genotype MTBDRplus: a further step toward rapid identification of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.** v. 46, p. 393–394, 2008.
- MORCILLO, N.; IMPERIALE, B.; Di GIULIO, B. Evaluation of MGIT 960™ and the colorimetric-based method for tuberculosis drug susceptibility testing. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 14(9), p. 1169–1175, 2010.
- MPAGAMA, S.G.; HOUP, E.R.; STROUP, S.; KUMBURU, H.; GRATZ, J.; KIBIKI, G.S.; HEYSELL, S.K. Application of quantitative second-line drug susceptibility testing at a multidrug-resistant tuberculosis hospital in Tanzania. **BMC Infect Dis.** v. 13, p. 432, 2013.
- ORENSTEIN, E.W.; BASU, S.; SHAH, N.S.; ANDREWS, J.R.; FRIEDLAND, G.H.; MOLL, A.P.; GANDHI, N.R.; GALVANI, A.P. Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis.** v. 9, p. 153-161, 2009.
- RAMASWAMY, S.; MUSSER, J.M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. **Tuberc Lung Dis.** v. 79, p. 3–29, 1998.

RAMASWAMY, S.V.; REICH, R.; DOU, S.J. et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemoter*, v. 47, p. 1241-50, 2003.

RASSLAN, O.; HAFEZ, S.F.; HASHEM, M.; AHMED, O.I.; FARAMAWY, M.A.S.; KHATER, W.S.; SALEH, D.A.; MOHAMED, M.I.; KHALIFA, M.A.M.; SHOUKRY, F.A. EL-MOGHAZY, E.H. Microscopic observation drug susceptibility assay in the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. v. 16(7), p. 941–946, 2012.

RODRIGUES, C.; JANI, J.; SHENAI, S.; THAKKAR, P.; SIDDIQI, S. MEHTA, A. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against second-line drugs using the Bactec MGIT 960 System. *Int J Tuberc Lung Dis*. v. 12(12), p. 1449–1455, 2008.

RÜSCH-GERDES, S.; DOMEHL, C.; NARDI, G.; GISMONDO, M.R.; WELSCHER, H.; PFYFFER, G.E. Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. *J Clin Microbiol*. v. 37(1), p. 45-48, 1999.

SAID, H.M.; KOCK, M.M.; ISMAIL, N.A.; BABA, K.; OMAR, S.V.; OSMAN, A.G.; HOOSEN, A.A.; EHLERS, M.M. Comparison between the BACTEC MGIT 960 system and the agar proportion method for susceptibility testing of multidrug resistant tuberculosis strains in a high burden setting of South Africa. *BMC Infect Dis*. v. 12, p. 369, 2012.

SCHÖN, T.; JUREÉN, P.; GISKE, C.G.; CHRYSANTHOU, E.; STUREGÅRD, E.; WERNGREN, J.; KAHLMETER, G.; HOFFNER, S.E.; ÄNGEBY, K.A. Evaluation of wild-type MIC distributions as a tool for determination of clinical breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. v. 64, p. 786–793, 2009.

SCHÖN, T.; JURÉEN, P.; CHRYSANTHOU, E.; GISKE, C.G.; KAHLMETER, G.; HOFFNER, S.; ANGEY, K. Rifampicin-resistant and rifabutin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains: a breakpoint artefact? *J Antimicrob Chemother*. v. 68, p. 2074–2077, 2013.

SHARMA, M.; THIBERT, L.; CHEDORE, P.; SHANDRO, C.; JAMIESON, F. TYRRELL, G.; CHRISTIANSON, S.; SOUALHINE, H.; WOLFE, J. Canadian multicenter laboratory study for standardized second-line antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. v. 49(12), p. 4112-4116, 2011.

SIDDIQI, S.H.; RÜSCH-GERDES, S. MGIT Procedure manual for BACTEC™ MGIT™ 960 TB system. Foundation for Innovative New Diagnostics. **Becton Dickinson**, Sparks, MD, USA: 2006.

SIRGEL, F.A.; TAIT, M.; WARREN, R.M.; STREICHER, E.M.; BÖTTGER, E.C.; VAN HELDEN, P.D.; VAN PITTIUS, N.C.G.; COETZEE, G.; HOOSAIN, E.Y.; CHABULANXIWENI, M.; HAYES, C.; VICTOR, T.C.; TROLLIP, A. Mutations in the *rrs* A1401G gene and phenotypic resistance to amikacin and capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microb Drug Resist.** v. 18(2), p. 193-197, 2012a.

SIRGEL, F.A.; WARREN, R.M.; STREICHER, E.M.; VICTOR, T.C.; VAN HELDEN, P.D.; BÖTTGER, E.C. *gyrA* mutations and phenotypic susceptibility levels to ofloxacin and moxifloxacin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother.** v. 67(5), p. 1088-1093, 2012b.

SPRINGER, B.; LUCKE, K.; CALLIGARIS-MAIBACH, R.C; RITTER, C.; BÖTTGER, E.C. Quantitative Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by Use of MGIT 960 and EpiCenter Instrumentation. **J Clin Microbiol.** v. 47(6), p. 1773-1780, 2009.

TROLLIP, A.P.; MOORE, D.; CORONEL, J.; CAVIEDES, L.; KLAGES, S.; VICTOR, T.; ROMANCENCO, E.; CRUDU, V.; AJBANI, K.; VINEET, V.P.; RODRIGUES, C.; JACKSON, R.L.; EISENACH, K.; GARFEIN, R.S.; RODWELL, T.C.; DESMOND, E.; GROESSL, E. J.; GANIATS, T.G.; CATANZARO, A. Second-line drug susceptibility breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis* using the MODS assay. **Int J Tuberc Lung Dis.** v. 18(2), p. 227–232, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE. Global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: fourth global report. WHO/HTM/TB/2008.394. Geneva: **WHO**, 2008a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. WHO/HTM/TB/2008.392. Geneva: **WHO**, 2008b.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control: WHO report 2011. WHO/HTM/TB/2011.16. Geneva: **WHO**, 2011a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis: policy statement. WHO/HTM/TB/2011.9. Geneva: **WHO**, 2011b.

YANG, B.; KOGA, H.; OHNO, H.; OGAWA, K.; FUKUDA, M.; HIRAKATA, Y.; MAESAKI, S.; TOMONO, K.; TASHIRO, T.; KOHNO, S. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother.** v. 42, p. 621–628, 1998.

ZHANG, Z.; WANG, Y.; PANG, Y.; KAM, K.M. Ethambutol resistance as determined by broth dilution method correlates better than sequencing results with *embB* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **J Clin Microbiol.** v. 52(2), p. 638-641, 2014.

ZHAO, L.; XIA, Q.; LIN, N.; LIU, B.; ZHAO, X.; LIU, Z.; WAN, K. Evaluation of BACTEC MGIT 960 system for the second-line drugs susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in China. **J Microbiol Methods.** v. 91(1), p. 212-214, 2012.

ANEXO A – Folha de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 06611912.8.0000.5149

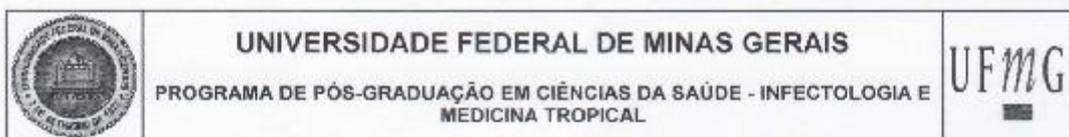
**Interessado(a): Profa. Silvana Spindola de Miranda
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 19 de outubro de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de cepas do Mycobacterium tuberculosis sensíveis e resistentes isoladas em Minas Gerais**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO B – Ata da defesa de dissertação de mestrado**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO
ALAN DOUGLAS GONÇALVES**

Realizou-se, no dia 19 de dezembro de 2014, às 14:00 horas, Sala 062 - Andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 271ª defesa de dissertação, intitulada "Concentração inibitória mínima de fármacos de primeira e segunda linha do *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente e mutações relacionadas à isoniazida e rifampicina em laboratório de referência de Minas Gerais, Brasil", apresentada por ALAN DOUGLAS GONÇALVES, número de registro 2013653390, graduado no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Silvana Spindola de Miranda - Orientador (UFMG), Profa. Andreia Maria Camargos Rocha (UFMG), Prof. Afranio Lineu Kritski (UFRJ).

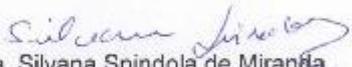
A Comissão considerou a dissertação:

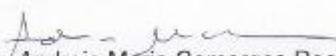
Aprovada

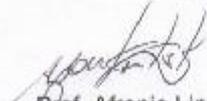
Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

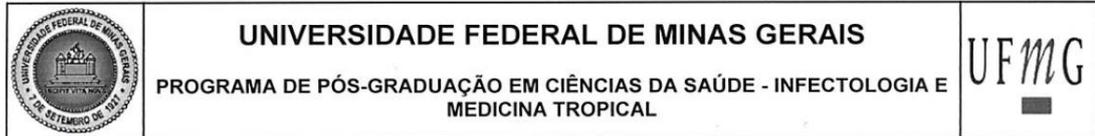
Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2014.


Profa. Silvana Spindola de Miranda


Profa. Andreia Maria Camargos Rocha


Prof. Afranio Lineu Kritski

ANEXO C – Folha de aprovação



FOLHA DE APROVAÇÃO

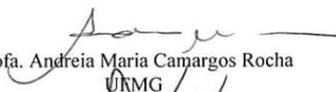
"Concentração inibitória mínima de fármacos de primeira e segunda linha do *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente e mutações relacionadas à isoniazida e rifampicina em laboratório de referência de Minas Gerais, Brasil"

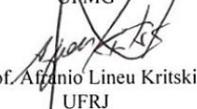
ALAN DOUGLAS GONÇALVES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical.

Aprovada em 19 de dezembro de 2014, pela banca constituída pelos membros:


 Prof. Silvana Spindola de Miranda - Orientador
 UFMG


 Prof. Andreia Maria Camargos Rocha
 UFMG


 Prof. Alanio Lineu Kritski
 UFRJ

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2014.

ANEXO D - Normas de publicação da revista *Journal of Clinical Microbiology*

Manuscript Submission Checklist

- *Double-space all text, including references and figure legends.*
- *Number pages.*
- *Number lines continuously.*
- *Present statistical treatment of data where appropriate.*
- *Format references in ASM style.*
- *Provide accession numbers for all newly published sequences in a dedicated paragraph, and if a sequence or sequence alignment important for evaluation of the manuscript is not yet available, provide the information as supplemental material not for publication or make the material available on a website for access by the editor and reviewers.*
- *Confirm that genetic and chemical nomenclature conforms to instructions.*
- *Include as supplemental material not for publication in-press and submitted manuscripts that are important for judgment of the present manuscript.*

As demais instruções e normas para publicação encontram-se disponíveis no endereço eletrônico: <http://jcm.asm.org/site/misc/ifora.xhtml>.

APÊNDICE A – Padrão de sensibilidade pelo método das proporções em Löwenstein Jensen/BACTEC® MGIT® 960 de fármacos de primeira e segunda linha de *M. tuberculosis* multirresistentes.

Código	INH	RIF	STR	EMB	AMK	OFX
R1	R	R	S	S	S	S
R3	R	R	S	S	S	S
R4	R	R	R	S	S	S
R5	R	R	S	S	S	S
R6	R	R	S	S	S	S
R9	R	R	S	S	S	S
R10	R	R	S	S	S	S
R11	R	R	S	S	S	S
R12	R	R	S	S	S	S
R13 ^a	R	R	R	R	S	R
R14	R	R	S	S	S	S
R15	R	R	R	S	S	S
R18	R	R	R	S	S	S
R19	R	R	S	S	S	S
R20	R	R	S	S	S	R
R24	R	R	R	S	S	S
R25	R	R	R	R	R	R
R27	R	R	S	R	S	S
R30	R	R	R	S	S	S
R31	R	R	R	S	S	S
R32	R	R	R	S	S	S
R33	R	R	R	S	S	S
R34	R	R	R	S	S	S
R38	R	R	S	S	S	S
R40	R	R	R	S	S	S
R43	R	R	R	S	S	S
R46	R	R	R	S	S	S
R48	R	R	R	S	S	S
R53	R	R	S	S	S	S
R57	R	R	R	S	S	S
R59	R	R	R	R	R	R
R60	R	R	S	S	S	S
R61	R	R	S	S	S	S
R62	R	R	S	S	S	S
R63	R	R	S	R	S	S
R65	R	R	S	S	S	S
R66	R	R	S	S	S	S
R67	R	R	S	S	S	S
R68	R	R	S	S	S	S
R69	R	R	S	R	S	S
R71	R	R	S	S	S	S
R72	R	R	S	S	S	S

Legenda: R: resistente; S: sensível; ^aXDR resistente a capreomicina (concentração crítica 2,5 µg/mL).

APÊNDICE B – Concentração inibitória mínima de isoniazida

Código	Controle	Concentrações (µg/mL)										MIC	TS	Resistência
		32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06			
R1	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4	P	Primária
R3	+	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	16	P	Adquirida
R4	+	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	16	M	Adquirida
R5	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4	P	Adquirida
R6	+	-	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4	P	Adquirida
R9	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R10	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4	P	Adquirida
R11	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	8	P	Adquirida
R12	+	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	1	P	Primária
R13	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4	P	Adquirida
R14	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4	P	Adquirida
R15	+	S	S	S	C	S	S	S	S	R	R	0,25	P	Adquirida
R18	+	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	32	P	Adquirida
R19	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R20	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4	P	Adquirida
R24	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R25	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R27	+	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,25	M	Adquirida
R30	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4	P	Primária
R31	+	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	16	P	Adquirida
R32	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R33	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4	P	Adquirida
R34	+	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	16	M	Adquirida
R38	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	2	M	Primária
R40	+	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	P	Adquirida
R43	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R46	+	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	16	P	-
R48	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R53	+	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	16	P	Adquirida
R57	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R59	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R60	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4	M	Adquirida
R61	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4	P	-
R62	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4	P	Primária
R63	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	-
R65	+	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	16	P	Adquirida
R66	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	-
R67	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	2	M	Primária
R68	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>32	P	Adquirida
R69	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>32	P	Adquirida
R71	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4	P	-
R72	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	-

MIC: concentração inibitória mínima; TS: teste de sensibilidade à concentração crítica; +: positivo; S: sensível; R: resistente; C: contaminado; -: não testada/sem informação; P: método das proporções em Löwenstein Jensen; M: BACTEC® MGIT® 960.

APÊNDICE C – Concentração inibitória mínima de rifampicina

Código	Controle	Concentrações (µg/mL)									MIC	TS	Resistência
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25			
R1	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Primária
R3	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R4	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	4	M	Adquirida
R5	+	S	S	S	S	S	S	R	R	R	2	P	Adquirida
R6	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R9	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R10	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R11	+	S	S	R	R	R	R	R	R	R	32	P	Adquirida
R12	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Primária
R13	+	S	R	R	R	R	R	R	R	R	64	P	Adquirida
R14	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R15	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	≤0,25	P	Adquirida
R18	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R19	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R20	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R24	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R25	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	P	Adquirida
R27	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	M	Adquirida
R30	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	P	Primária
R31	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	16	P	Adquirida
R32	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R33	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R34	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	M	Adquirida
R38	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	M	Primária
R40	+	S	S	S	S	S	S	S	S	R	0,5	P	Adquirida
R43	+	S	R	R	R	R	R	R	R	R	64	P	Adquirida
R46	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	-
R48	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R53	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R57	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R59	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R60	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	M	Adquirida
R61	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	-
R62	+	S	R	R	R	R	R	R	R	R	64	P	Primária
R63	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	≤0,25	P	-
R65	+	S	S	S	S	S	S	S	R	R	1	P	Adquirida
R66	+	S	S	S	S	S	S	S	S	R	0,5	P	-
R67	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	M	Primária
R68	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R69	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	Adquirida
R71	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	-
R72	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	>64	P	-

MIC: concentração inibitória mínima; TS: teste de sensibilidade à concentração crítica; +: positivo; S: sensível; R: resistente; P: método das proporções em Löwenstein Jensen; M: BACTEC® MGIT® 960; -: sem informação.

APÊNDICE D – Concentração inibitória mínima de estreptomicina

Código	Controle	Concentrações (µg/mL)											MIC	TS	Resistência
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06			
R1	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	P	Primária
R3	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R4	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	>64	M	Adquirida
R5	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	P	Adquirida
R6	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R9	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	P	Adquirida
R10	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	0,25	P	Adquirida
R11	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	P	Adquirida
R12	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	P	Primária
R13	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	4	P	Adquirida
R14	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	P	Adquirida
R15	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	4	P	Adquirida
R18	+	S	S	S	S	S	S	S	R	R	-	-	1	P	Adquirida
R19	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R20	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R24	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	4	P	Adquirida
R25	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	-	-	16	P	Adquirida
R27	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R30	+	S	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	64	P	Primária
R31	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	4	P	Adquirida
R32	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	>64	P	Adquirida
R33	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	-	-	16	P	Adquirida
R34	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	-	-	8	M	Adquirida
R38	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Primária
R40	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	-	-	16	P	Adquirida
R43	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	4	P	Adquirida
R46	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	-	-	16	P	-
R48	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	-	-	8	P	Adquirida
R53	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R57	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	-	-	16	P	Adquirida
R59	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	-	-	16	P	Adquirida
R60	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R61	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	0,25	P	-
R62	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	R	2	P	Primária
R63	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	P	-
R65	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	P	Adquirida
R66	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	0,25	P	-
R67	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	0,25	M	Primária
R68	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	0,25	P	Adquirida
R69	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	P	Adquirida
R71	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	P	-
R72	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	0,5	P	-

MIC: concentração inibitória mínima; TS: teste de sensibilidade à concentração crítica; +: positivo; S: sensível; R: resistente; -: não testada/sem informação; P: método das proporções em Löwenstein Jensen; M: BACTEC® MGIT® 960.

APÊNDICE E – Concentração inibitória mínima de etambutol

Código	Controle	Concentrações (µg/mL)										MIC	TS	Resistência
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12			
R1	+	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	0,5	P	Primária
R3	+	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	4	P	Adquirida
R4	+	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	4	M	Adquirida
R5	+	S	S	S	S	S	S	S	R	R	-	1	P	Adquirida
R6	+	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	1	P	Adquirida
R9	+	-	-	S	S	S	S	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R10	+	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	1	P	Adquirida
R11	+	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	1	P	Adquirida
R12	+	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	1	P	Primária
R13	+	S	S	R	R	R	R	R	R	R	-	32	P	Adquirida
R14	+	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	4	P	Adquirida
R15	+	-	-	S	S	S	S	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R18	+	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	4	P	Adquirida
R19	+	-	-	S	S	S	S	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R20	+	-	-	S	S	S	S	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R24	+	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	0,5	P	Adquirida
R25	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	-	16	P	Adquirida
R27	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	-	16	M	Adquirida
R30	+	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	4	P	Primária
R31	+	-	-	S	S	S	S	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R32	+	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	1	P	Adquirida
R33	+	-	-	S	S	S	S	R	R	R	R	2	P	Adquirida
R34	+	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	4	M	Adquirida
R38	+	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	1	M	Primária
R40	+	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	4	P	Adquirida
R43	+	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	1	P	Adquirida
R46	+	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	1	P	-
R48	+	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	0,5	P	Adquirida
R53	+	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	4	P	Adquirida
R57	+	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	0,5	P	Adquirida
R59	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	-	16	P	Adquirida
R60	+	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	4	M	Adquirida
R61	+	-	-	S	S	S	S	R	R	R	R	2	P	-
R62	+	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	4	P	Primária
R63	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	-	8	P	-
R65	+	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	1	P	Adquirida
R66	+	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	0,5	P	-
R67	+	-	-	S	S	S	S	R	R	R	R	2	M	Primária
R68	+	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	4	P	Adquirida
R69	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	-	8	P	Adquirida
R71	+	-	-	S	S	S	R	R	R	R	R	4	P	-
R72	+	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	1	P	-

MIC: concentração inibitória mínima; TS: teste de sensibilidade à concentração crítica; +: positivo; S: sensível; R: resistente; -: não testada/sem informação; P: método das proporções em Löwenstein Jensen; M: BACTEC® MGIT® 960.

APÊNDICE F – Concentração inibitória mínima de amicacina

Código	Controle	Concentrações (µg/mL)										MIC	TS	Resistência
		32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06			
R1	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Primária
R3	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R4	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Adquirida
R5	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R6	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R9	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R10	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R11	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Adquirida
R12	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	0,25	M	Primária
R13	+	S	S	S	S	S	S	R	R	R	-	1	M	Adquirida
R14	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Adquirida
R15	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R18	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R19	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Adquirida
R20	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Adquirida
R24	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R25	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	>32	M	Adquirida
R27	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R30	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Primária
R31	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Adquirida
R32	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R33	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Adquirida
R34	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Adquirida
R38	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Primária
R40	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Adquirida
R43	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Adquirida
R46	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	-
R48	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Adquirida
R53	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R57	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Adquirida
R59	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	>32	M	Adquirida
R60	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R61	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	-
R62	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	Primária
R63	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	-
R65	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R66	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	0,25	M	-
R67	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Primária
R68	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R69	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R71	+	-	-	-	S	S	S	S	R	R	R	0,5	M	-
R72	+	-	-	-	S	S	S	R	R	R	R	1	M	-

MIC: concentração inibitória mínima; TS: teste de sensibilidade à concentração crítica; +: positivo; S: sensível; R: resistente; -: não testada/sem informação; M: BACTEC® MGIT® 960.

APÊNDICE G – Concentração inibitória mínima de levofloxacin

Código	Controle	Concentrações (µg/mL)												MIC	TS	Resistência
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03			
R1	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	R	0,5	M	Primária
R3	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	C	R	0,25	M	Adquirida
R4	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	-	0,5	M	Adquirida
R5	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Adquirida
R6	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	R	0,25	M	Adquirida
R9	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R10	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	R	0,25	M	Adquirida
R11	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	C	R	0,25	M	Adquirida
R12	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	R	0,5	M	Primária
R13	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	-	-	8	M	Adquirida
R14	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	R	0,25	M	Adquirida
R15	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Adquirida
R18	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Adquirida
R19	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R20	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	-	-	4	M	Adquirida
R24	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Adquirida
R25	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	-	-	8	M	Adquirida
R27	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Adquirida
R30	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Primária
R31	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Adquirida
R32	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Adquirida
R33	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Adquirida
R34	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Adquirida
R38	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	R	0,5	M	Primária
R40	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Adquirida
R43	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	C	-	0,25	M	Adquirida
R46	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	-
R48	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Adquirida
R53	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	-	-	4	M	Adquirida
R57	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Adquirida
R59	+	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	2	M	Adquirida
R60	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	R	0,5	M	Adquirida
R61	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	R	0,25	M	-
R62	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Primária
R63	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	-
R65	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Adquirida
R66	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	-
R67	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Primária
R68	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	-
R69	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	Adquirida
R71	+	-	-	-	S	S	S	S	S	S	R	R	-	0,25	M	-
R72	+	-	-	-	S	S	S	S	S	R	R	R	-	1	M	-

MIC: concentração inibitória mínima; TS: teste de sensibilidade à concentração crítica; +: positivo; S: sensível; R: resistente; C: contaminado; -: não testada/sem informação; M: BACTEC® MGIT® 960.

APÊNDICE H – Concentração inibitória mínima de cicloserina

Código	Controle	Concentrações (µg/mL)										MIC	Resistência
		128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25		
R1	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	Primária
R3	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R4	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R5	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R6	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R9	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R10	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R11	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R12	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	Primária
R13	+	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	16	Adquirida
R14	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R15	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R18	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R19	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R20	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R24	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	Adquirida
R25	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	Adquirida
R27	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	Adquirida
R30	+	S	S	S	S	S	S	R	R	-	-	4	Primária
R31	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	Adquirida
R33	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	Adquirida
R34	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	Adquirida
R40	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	Adquirida
R46	+	S	S	S	S	S	S	R	R	-	-	4	-
R53	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	Adquirida
R59	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	Adquirida
R63	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	-
R65	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	Adquirida
R66	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	-
R67	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	Primária
R69	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	Adquirida
R72	+	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	8	-

MIC: concentração inibitória mínima; +: positivo; S: sensível; R: resistente; -: não testada/sem informação.

APÊNDICE I – Concentração inibitória mínima de rifabutina

Código	Controle	Concentrações (µg/mL)										MIC	Resistência
		16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03		
R1	+	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	8	Primária
R3	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	4	Adquirida
R4	+	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-	0,12	Adquirida
R5	+	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,25	Adquirida
R6	+	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R9	+	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	16	Adquirida
R10	+	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R11	+	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,12	Adquirida
R12	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	4	Primária
R13	+	-	S	S	R	R	R	R	R	R	-	4	Adquirida
R14	+	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R15	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	0,06	Adquirida
R18	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	4	Adquirida
R19	+	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	8	Adquirida
R20	+	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	4	Adquirida
R24	+	-	R	R	R	R	R	R	R	R	-	≥16	Adquirida
R25	+	-	S	S	S	S	S	S	R	-	-	0,25	Adquirida
R27	+	-	R	R	R	R	R	R	R	R	-	≥16	Adquirida
R30	+	-	S	S	S	S	S	S	S	-	-	≤0,12	Primária
R31	+	-	S	S	S	S	S	R	R	-	-	0,5	Adquirida
R34	+	-	R	R	R	R	R	R	R	R	-	≥16	Adquirida
R46	+	-	R	R	R	R	R	R	R	R	-	≥16	-
R53	+	-	R	R	R	R	R	R	R	R	-	≥16	Adquirida
R59	+	-	S	S	R	R	R	R	R	R	-	4	Adquirida
R63	+	-	S	S	S	S	S	S	S	S	-	≤0,12	-
R65	+	-	S	S	S	S	S	S	S	S	-	≤0,12	Adquirida
R66	+	-	S	S	S	S	S	S	S	S	-	≤0,12	-
R67	+	-	S	S	R	R	R	R	R	R	-	4	Primária

MIC: concentração inibitória mínima; +: positivo; S: sensível; R: resistente; -: não testada/sem informação.

APÊNDICE J – Concentração inibitória mínima de cepas de *M. tuberculosis* sensíveis

Código	Fármaco	Controle	Concentrações (µg/mL)												MIC
			16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,015	0,007	
S1	INH	+	-	-	S	S	S	S	S	S	C	S	S	R	0,015
S2	INH	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	0,015
S3	INH	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
S4	INH	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	0,06
S5	INH	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	0,06
S6	INH	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
S7	INH	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
S8	INH	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
S9	INH	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	0,06
S10	INH	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
ATCC	INH	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	≤0,03
S1	RIF	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
S2	RIF	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	0,015
S3	RIF	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	0,015
S4	RIF	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
S5	RIF	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
S6	RIF	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	0,015
S7	RIF	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
S8	RIF	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	0,06
S9	RIF	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	0,06
S10	RIF	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
ATCC	RIF	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	≤0,03
S1	STR	+	-	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S2	STR	+	-	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S3	STR	+	-	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S4	STR	+	-	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S5	STR	+	-	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S6	STR	+	-	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S7	STR	+	-	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S8	STR	+	-	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-	1
S9	STR	+	-	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-	1
S10	STR	+	-	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
ATCC	STR	+	-	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-	≤1
S1	EMB	+	S	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S2	EMB	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-	1
S3	EMB	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-	1
S4	EMB	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-	1
S5	EMB	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-	1
S6	EMB	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-	1
S7	EMB	+	S	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S8	EMB	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	-	-	-	2
S9	EMB	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-	1
S10	EMB	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	-	-	-	2
ATCC	EMB	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-	1

MIC: concentração inibitória mínima; +: positivo; S: sensível; R: resistente; C: contaminado; -: não testada/sem informação; ATCC: *M. tuberculosis* ATCC 27294; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; STR: estreptomicina; EMB: etambutol.

Continua na próxima página.

**APÊNDICE J – Concentração inibitória mínima de cepas de *M. tuberculosis* sensíveis -
continuação**

Código	Fármaco	Controle	Concentrações (µg/mL)											MIC
			8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,015	0,007	
S1	AMK	+	-	S	S	S	S	S	R	R	-	-	-	0,25
S2	AMK	+	-	S	S	S	S	S	R	R	-	-	-	0,25
S3	AMK	+	-	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S4	AMK	+	-	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S5	AMK	+	-	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S6	AMK	+	-	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S7	AMK	+	-	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S8	AMK	+	-	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S9	AMK	+	-	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S10	AMK	+	-	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
ATCC	AMK	+	-	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	0,5
S1	LVX	+	S	S	S	S	S	S	S	R	R	-	-	0,12
S2	LVX	+	S	C	S	S	S	S	S	S	R	-	-	0,06
S3	LVX	+	S	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	0,25
S4	LVX	+	S	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	0,25
S5	LVX	+	S	S	S	S	R	R	R	R	R	-	-	1
S6	LVX	+	S	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	0,25
S7	LVX	+	S	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	0,25
S8	LVX	+	S	S	S	S	S	R	R	R	R	-	-	0,5
S9	LVX	+	S	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	0,25
S10	LVX	+	S	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	0,25
ATCC	LVX	+	S	S	S	S	S	S	R	R	R	-	-	0,25
S1	RFB	+	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	≤0,015
S2	RFB	+	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	≤0,015
S3	RFB	+	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
S4	RFB	+	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
S5	RFB	+	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	0,015
S6	RFB	+	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
S7	RFB	+	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
S8	RFB	+	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
S9	RFB	+	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	0,015
S10	RFB	+	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	0,03
ATCC	RFB	+	-	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	≤0,03

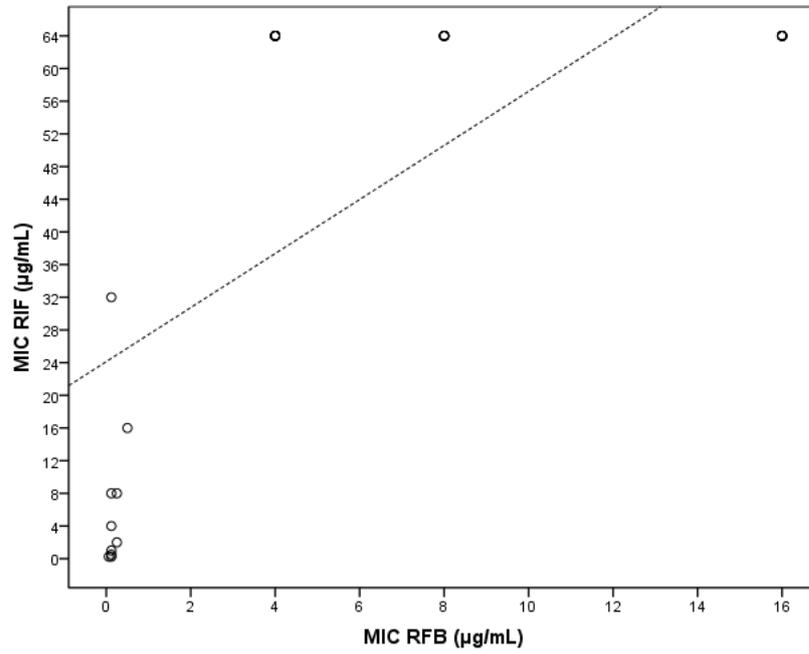
MIC: concentração inibitória mínima; +: positivo; S: sensível; R: resistente; C: contaminado; -: não testada/sem informação; ATCC: *M. tuberculosis* ATCC 27294; AMK: amicacina; LVX: levofloxacino; RFB: rifabutina.

Continua na próxima página.

**APÊNDICE J – Concentração inibitória mínima de cepas de *M. tuberculosis* sensíveis -
continuação**

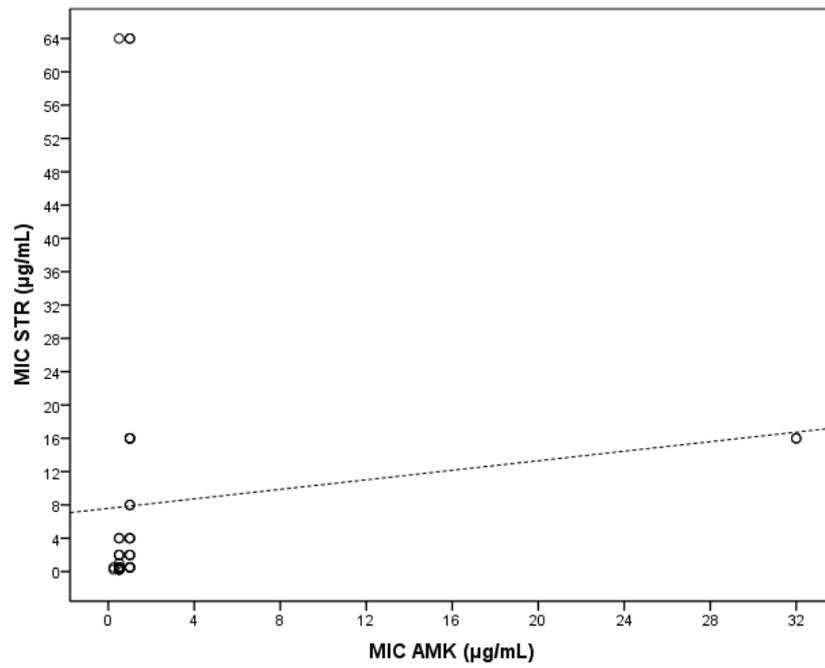
Código	Fármaco	Controle	Concentrações (µg/mL)								MIC
			128	64	32	16	8	4	2	1	
S1	CIC	+	S	S	S	S	S	R	R	R	8
S2	CIC	+	S	S	S	S	S	R	R	R	8
S3	CIC	+	S	S	S	S	S	R	R	R	8
S4	CIC	+	S	S	S	S	S	R	R	R	8
S5	CIC	+	S	S	S	S	S	R	R	R	8
S6	CIC	+	S	S	S	S	S	R	R	R	8
S7	CIC	+	S	S	S	S	S	R	R	R	8
S8	CIC	+	S	S	S	S	S	R	R	R	8
S9	CIC	+	S	S	S	S	S	R	R	R	8
S10	CIC	+	S	S	S	S	S	R	R	R	8
ATCC	CIC	+	S	S	S	S	S	S	R	R	4

MIC: concentração inibitória mínima; +: positivo; S: sensível; R: resistente; ATCC: *M. tuberculosis* ATCC 27294; CIC: cicloserina.

APÊNDICE K – Correlação de MIC de RIF e RFB de *M. tuberculosis* MDR/XDR

RIF: rifampicina; RFB: rifabutina.

Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE L – Correlação de MIC de STR e AMK de *M. tuberculosis* MDR/XDR

STR: estreptomicina; AMK: amicacina.

Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE M – Resultados de mutações em *rpoB* por Genotype MTBDRplus® de cepas de *M. tuberculosis* MDR/XDR

Código	Mutações	MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MTBDRplus
	<i>rpoB</i>	RIF	RFB	
R1	H526D	>64	8	R
R3	H526D	>64	4	R
R4	-	4	0,12	R
R5	D516V	2	0,25	R
R6	S531L	>64	8	R
R10	S531L	>64	8	R
R11	D516V	32	0,12	R
R12	S531L	>64	4	R
R13	S531L	64	4	R
R14	-	>64	8	R
R15	S531L	≤0,25	0,06	R
R18	S531L	>64	4	R
R19	S531L	>64	8	R
R20	S531L	>64	4	R
R24	H526D	>64	≥16	R
R25	D516V	8	0,25	R
R27	S531L	>64	≥16	R
R30	D516V	8	≤0,12	R
R31	D516V	16	0,5	R
R32	S531L	>64	-	R
R33	-	>64	-	R
R34	H526Y	>64	≥16	R
R40	-	0,5	-	R
R43	-	64	-	R
R46	H526Y	>64	≥16	R
R48	H526D	>64	-	R
R53	H526Y	>64	≥16	R
R57	-	>64	-	R
R59	S531L	>64	4	R
R60	S531L	>64	-	R
R61	H526D	>64	-	R
R62	-	64	-	R
R63	-	≤0,25	≤0,12	S
R65	D516V	1	≤0,12	R
R66	-	0,5	≤0,12	R
R67	H526D	>64	4	R
R68	S531L	>64	-	R
R69	D516V e H526D	>64	-	R
R71	H526D	>64	-	R
R72	S531L	>64	-	R

RIF: rifampicina; RFB: rifabutina; MTBDRplus: Genotype MTBDRplus®; -: sem mutação detectável; R: resistente; S: sensível.

APÊNDICE N – Resultados de mutações em *katG* e região promotora de *inhA* por Genotype MTBDRplus® de cepas de *M. tuberculosis* MDR/XDR

Código	Mutações		MIC (µg/mL)	MTBDRplus
	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	INH	
R1	S315T	-	4	R
R3	S315T	C15T	16	R
R4	S315T	C15T	16	R
R5	S315T	-	4	R
R6	S315T	-	4	R
R10	-	-	4	S
R11	S315T	-	8	R
R12	S315T	-	1	R
R13	S315T	-	4	R
R14	S315T	-	4	R
R15	-	-	0,25	S
R18	S315T	C15T	32	R
R19	S315T	-	2	R
R20	S315T	-	4	R
R24	S315T	-	2	R
R25	S315T	-	2	R
R27	-	-	0,25	S
R30	S315T	-	4	R
R31	S315T	C15T	16	R
R32	S315T	-	2	R
R33	S315T	-	4	R
R34	S315T	C15T	16	R
R40	-	C15T	0,5	R
R43	S315T	-	2	R
R46	S315T	C15T	16	R
R48	S315T	-	2	R
R53	S315T	C15T	16	R
R57	S315T	-	2	R
R59	-	-	2	R
R60	S315T	-	4	R
R61	S315T	-	4	R
R62	S315T	-	4	R
R63	S315T	-	2	R
R65	-	-	16	S
R66	-	C15T	2	R
R67	S315T	-	2	R
R68	-	-	>32	R
R69	-	-	>32	S
R71	S315T	-	4	R
R72	S315T	-	2	R

INH: isoniazida; MTBDRplus: Genotype MTBDRplus®; -: sem mutação detectável R: resistente; S: sensível.

APÊNDICE O – Resultados de mutações em *rpoB*, *katG* e região promotora de *inhA* por Genotype MTBDRplus® de cepas de *M. tuberculosis* sensíveis

Código	Mutações		MIC (µg/mL)	MTBDRplus
	<i>rpoB</i>		RIF	
S1	-	-	0,03	S
S2	-	-	0,015	S
S3	-	-	0,015	S
S4	-	-	0,03	S
S5	-	-	0,03	S
S6	-	-	0,015	S
S7	-	-	0,03	S
S8	-	-	0,06	S
S9	-	-	0,06	S
S10	-	-	0,03	S
ATCC	-	-	≤0,03	S

RIF: rifampicina; MTBDRplus: Genotype MTBDRplus®; ATCC: *M. tuberculosis* ATCC 27294; -: sem mutação detectável; S: sensível.

Código	Mutações		MIC (µg/mL)	MTBDRplus
	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	INH	
S1	-	-	0,015	S
S2	-	-	0,015	S
S3	-	-	0,03	S
S4	-	-	0,06	S
S5	-	-	0,06	S
S6	-	-	0,03	S
S7	-	-	0,03	S
S8	-	-	0,03	S
S9	-	-	0,06	S
S10	-	-	0,03	S
ATCC	-	-	≤0,03	S

INH: isoniazida; MTBDRplus: Genotype MTBDRplus®; ATCC: *M. tuberculosis* ATCC 27294; -: sem mutação detectável; S: sensível.