

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

LIDA JOUCA DE ASSIS FIGUEREDO

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS GENOTÍPICOS E  
CARACTERIZAÇÃO DE HETERORRESISTÊNCIA EM  
PACIENTES COM TUBERCULOSE**

Belo Horizonte 2018

LIDA JOUCA DE ASSIS FIGUEREDO

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS GENOTÍPICOS E  
CARACTERIZAÇÃO DE HETERORRESISTÊNCIA EM  
PACIENTES COM TUBERCULOSE**

**Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós Graduação em  
Infectologia e Medicina Tropical, como requisito para a obtenção do título  
de Mestre em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical.**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Silvana Spíndola de Miranda**

**Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Wânia da Silva Carvalho**

Belo Horizonte  
2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Reitora**

Sandra Regina Goulart Almeida

**Vice Reitor**

Alessandro Moreira

**Pró Reitor de Pós Graduação**

Fábio Alves

**Pró Reitor de Pesquisa**

Mário Campos

**FACULDADE DE MEDICINA**

**Diretor**

Humberto José Alves

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical**

**Coordenador**

Eduardo Antônio Ferraz Coelho

**Subcoordenador**

Antonio Luiz Pinho Ribeiro

**Colegiado**

Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Vandack Alencar Nobre Jr.

Antônio Luiz Pinheiro Ribeiro

Denise Utsch Gonçalves

Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Unai Tupinambás

Thaís Teodoro de Oliveira Santos

Aos meus amados pais, Célia e Célio, por todo amor e  
pelo apoio incondicional nas minhas escolhas, hoje e  
sempre.

A Silvana, Wânia e Isabela por todo trabalho  
desenvolvido desde a graduação e pela amizade  
construída ao longo desses anos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço às professoras Silvana Spíndola de Miranda e Wânia da Silva Carvalho.

À pesquisadora Regina Bonnes Barcellos que muito me ensinou e foi sempre minha companheira.

Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Micobactérias, em especial à Isabela, Grazielle, Lucas e Juliana pelo companheirismo, força, cooperação e amizade.

Aos amigos que passaram pelo Grupo de Pesquisa em Micobactérias, em especial ao Cláudio, Nathália, Nyanne e Valéria que me incentivaram desde a graduação e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Micobactérias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais pelo apoio e colaboração. Em especial a Vera Lúcia, por toda paciência, cuidado, carinho por todos esses anos.

À coordenação e aos professores do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial para os membros do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, pelos ensinamentos e apoio na realização deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Centro Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro a este projeto.

Aos meus familiares e amigos que sempre estiveram por perto mesmo que distante, pelo apoio e motivação para seguir os meus sonhos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*Ensinar não é transferir conhecimento, mas  
criar as possibilidades para a sua produção.  
Quem ensina aprende ao ensinar e quem  
aprende ensina ao aprender.*

*Paulo Freire*

## RESUMO

A dificuldade em detectar resistência na tuberculose pode levar a um tratamento inadequado e à falha terapêutica e aumentar a disseminação de bactérias resistentes, o que pode gerar a heterorresistência. A coexistência de isolados sensíveis e resistentes aos fármacos em um mesmo indivíduo é considerada a etapa preliminar para a resistência total. O objetivo foi avaliar o desempenho de diferentes métodos genotípicos para detecção da heterorresistência do *Mycobacterium tuberculosis* aos fármacos rifampicina e isoniazida e sua caracterização. Foram incluídos 654 isolados do *M. tuberculosis* provenientes de pacientes do estado de Minas Gerais no período de 2009 a 2017. O GenoType MTBDR<sub>plus</sub><sup>®</sup> e o sequenciamento dos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* foram utilizados na detecção da heterorresistência e *Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem Repeat* (MIRU-VNTR) para caracterização de infecção mista e heterogeneidade clonal em isolados heterorresistentes. Dos 654 isolados, 520 eram sensíveis e 134 resistentes, e desses, 29 apresentaram heterorresistência à rifampicina e/ou isoniazida. O GenoType detectou a heterorresistência em 26/29 (89,7%) no *rpoB*, 5/29 (17,2%) no *katG* e 2/29 (6,9%) no *inhA*, sendo três isolados concomitantes tanto no *rpoB* quanto no *katG*. Em um isolado a heterorresistência estava presente nos três genes. O sequenciamento detectou a heterorresistência em 7/29 (24,1%) no *rpoB*, 3/29 (10,3%) no *katG* e nenhuma no *inhA*. Em um isolado, a heterorresistência foi concomitante nos genes *rpoB* e *katG*. O MIRU-VNTR detectou infecção mista em três isolados heterorresistentes, apresentando dois alelos distintos em dois ou mais *loci* sugerindo a presença de duas linhagens diferentes, sendo 2/3 Ugandal/Haarlem e 1/3 LAM/Ugandal. A heterogeneidade clonal ocorreu em quatro isolados que apresentaram dois alelos distintos em apenas um *loci* e demonstrou ser da linhagem LAM. O perfil sociodemográfico dos pacientes com isolados heterorresistentes foi predominantemente do sexo masculino 23/29 (79,3%), com a faixa etária entre 35 a 59 anos 20/29 (69%) e da raça/cor negra 17/29 (58,6%). O alcoolismo foi a principal comorbidade 12/29 (41,4%). A cura em pacientes ocorreu 15/29 (51,8%), o abandono do tratamento em 5/29 (17,3%), óbito por TB em 3/29 (10,3%), 2/29 (6,9%) em tratamento, 1/29 (3,4%) óbito por outras causas e 3/29 (10,3%) o desfecho não foi conhecido. O GenoType foi método genotípico que mais detectou a heterorresistência. O MIRU-VNTR demonstrou infecção mista e heterogeneidade clonal. Dos pacientes que apresentaram heterorresistência a maioria realizou tratamento prévio e tinha história de abandono.

## ABSTRACT

The difficulty in detecting resistance may lead to inadequate treatment and therapeutic failure and as consequence increase the spread of resistant bacteria, which can generate heteroresistance. The heteroresistance is the coexistence of drug-sensitive and sensitive strains in the same individual, considered the preliminary stage for total resistance. The objective of this study was to evaluate different genotypic methods for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* heteroresistance to rifampicin and isoniazid drugs and their characterization. A total of 654 *M. tuberculosis* isolates of 654 patients in the state of Minas Gerais from 2009 to 2017 were included. The genotype MTBDR*plus*<sup>®</sup> and genomic sequencing were used to detect heteroresistance and *Mycobacterial Interspersed Repeat-Unit-Variable-Number-Tandem Repeat* (MIRU-VNTR) for characterization of mixed infection and clonal heterogeneity in heteroresistant isolates. Of the 654 isolates, 520 were sensitives and 134 resistant, of which 29 had heteroresistance to rifampicin and/or isoniazid. GenoType MTBDR*plus*<sup>®</sup> detected heteroresistance in 26/29 (89.7%) in *rpoB*, 5/29 (17.2%) in *katG* and 2/29 (6.9%) in *inhA*, three of which were concomitant in the *rpoB* and *katG*. In one isolate, the heteroresistance was present in the three genes. Sequencing detected heteroresistance in 7/29 (24.1%) in *rpoB*, 3/29 (10.3%) in *katG* and none in *inhA*. In one isolate, heteroresistance was concomitant in the *rpoB* and *katG* genes. MIRU-VNTR detected mixed infection in three heteroresistance isolates, presenting two distinct alleles at two or more loci suggesting the presence of two different strains, being 2/3 Ugandal/Haarlem and 1/3 LAM/Ugandal. The clonal heterogeneity occurred in four isolates that presented two distinct alleles in only one locus and proved to be of the LAM lineage. The socio-demographic profile of patients with heteroresistance was predominantly male 23/29 (79.3%), with the age range between 35-59 years old (69%) and race / black color 17/29 (58, 6%). Alcoholism was the major comorbidity 12/29 (41.4%). The cure occurred in 15/29 (51.8%), abandonment in 5/29 (17.3%), TB death in 3/29 (10.3%), 2/29 (6.9%) in treatment, 1/29 (3.4%) non-TB death and 3/29 (10.3%) had no known outcome. GenoType MTBDR*plus*<sup>®</sup> was the genotypic method that most detected heteroresistance. MIRU-VNTR demonstrated mixed infection and clonal heterogeneity. Of the patients who presented heteroresistance the majority had previous treatment and had a history of abandonment.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM: Amicacina

CFZ: Clofazemina

CM: Capreomicina

E: Etambutol

Et: Etionamida

FUNED: Fundação Ezequiel Dias

Fw: Forward

HC: Hospital das Clínicas

HJK: Hospital Júlia Kubitschek

INH: Isoniazida

LACEN-MG: Laboratório Central de Minas Gerais

LAM: Latin-American-Mediterranean

LJ: Lowentein-Jensen

LPM/FM: Laboratório em Pesquisa de Micobactérias/ Faculdade de Medicina

LSPBM/FF: Laboratório de Saúde Pública e Biologia Molecular/ Faculdade de Farmácia

LZD: Linezolida

*M. tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*

MXF: Moxifloxacina

MGIT: Mycobacteria Growth Indicator Tube

MIC: Concentração Inibitória Mínima

MIRU-VNTR: Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit–Variable Number Tandem Repeat

MNT: Micobactérias Não Tuberculosas

OFX: Ofloxacina

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAS: ácido *p*-aminosalicílico

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RIF: Rifampicina

Rpm: Rotação por minuto

Rv: Reverse

S: Estreptomicina

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TB: Tuberculose

TB-MDR: Tuberculose Multidroga Resistente

TB-RR: Tuberculose Rifampicina Resistente

TB-XDR: Tuberculose Extensivamente Resistente

TE: Tampão de Eluição

TRD: Terizidona

TRM-TB: Teste Rápido Molecular para Tuberculose

TS: Teste de Sensibilidade

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UV: Ultravioleta

V: Volts

WHO: World Health Organization

WT: *wild type*

Z: Pirazinamida

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Mutações dos genes <i>rpoB</i> , <i>katG</i> e <i>inhA</i> detectados pelo GenoType MTBDR <i>plus</i> <sup>®</sup>	11
<b>Tabela 2.</b> Lista dos <i>primers</i> referentes à técnica Sequenciamento de Sanger.	13
<b>Tabela 3.</b> Lista dos <i>primers</i> referentes à técnica 24 loci MIRU-VNTR.	14

## LISTA DE FIGURAS

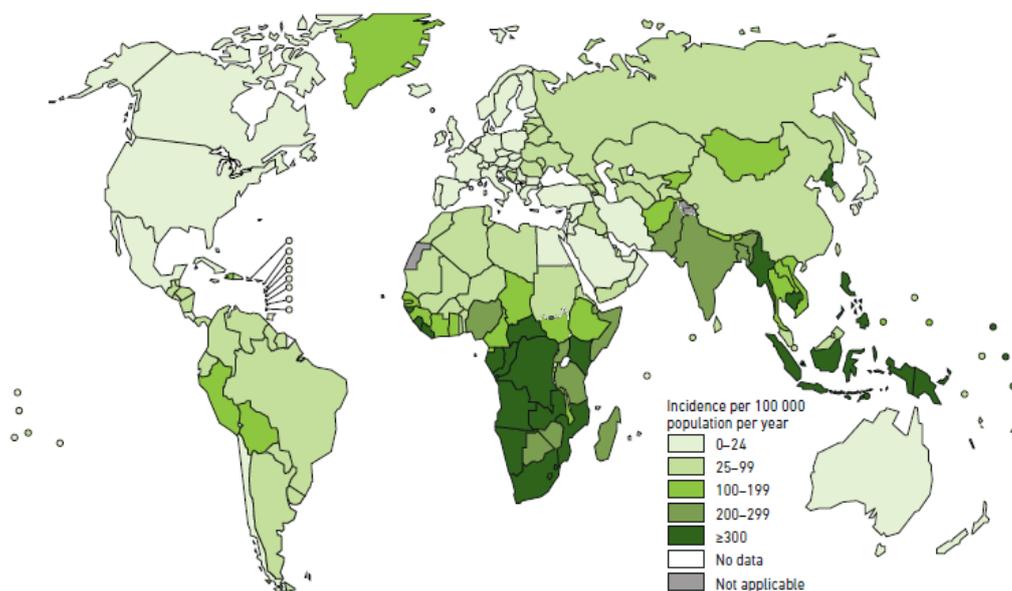
- Figura 1.** Estimativa mundial das taxas de incidência de TB por 100 mil habitantes, 2017. 1
- Figura 2.** Porcentagem de novos casos de TB-MDR/ TB-RR. 2

# SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>1.1 JUSTIFICATIVA</b>	6
<b>2.0 OBJETIVOS</b>	7
2.1 Objetivos gerais	7
2.2 Objetivos específicos	7
<b>3.0 METODOLOGIA</b>	8
3.1 Aspectos éticos	8
3.2 Delineamento e local do estudo	8
3.3 Critérios de Inclusão	8
3.4 Critérios de Exclusão	8
3.5 Isolamentos Bacteriano	9
3.6 Extrações de DNA	9
3.7 Verificação da presença de DNA extraído	9
3.8 Técnicas moleculares para detecção da heterorresistência	9
3.8.1 GenoType MTBDR <sup>plus</sup> <sup>®</sup>	9
3.8.2 Sequenciamento de Sanger	12
3.9 Caracterização da infecção mista em isolados heterorresistentes	14
3.9.1 MIRU-VNTR 24 <i>loci</i>	14
<b>4.0 NOTA EXPLICATIVA</b>	16
4.1 Artigo: Detecção da heterorresistência a rifampicina e isoniazida do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em Minas Gerais, Brasil	17
<b>5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	34
<b>6.0 PERSPECTIVAS</b>	35
<b>7.0 REFERÊNCIAS</b>	36
<b>8.0 ANEXOS</b>	40
8.1 Anexo A – Folha de Aprovação no Comitê de Ética	40
8.2 Anexo B – Folha de Aprovação do Mestrado	41

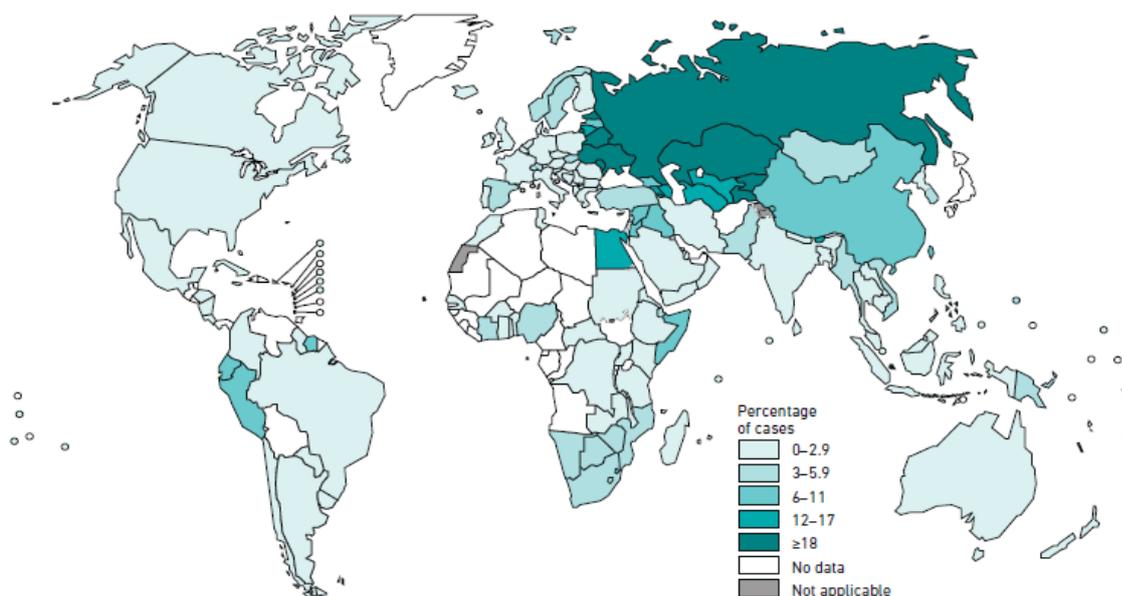
## 1.0 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é um grande problema de saúde pública, sendo a doença infecciosa de único agente que mais mata no mundo. Estima-se que 25% da população mundial estão infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Em 2017 a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que 10 milhões de pessoas desenvolvessem TB, com uma incidência de 133/100 mil habitantes. As estimativas das taxas de incidência no mundo estão representadas na Figura 1 (WHO, 2018).



**Figura 1.** Estimativa mundial das taxas de incidência de TB por 100 mil habitantes, 2017. Fonte: WHO, 2018

Em 2017, foi estimado que em todo o mundo, 558 mil pessoas desenvolveriam TB resistente à rifampicina (TB-RR), e destes, 82% teriam TB multidroga resistente (TB-MDR) que consiste na resistência do *M. tuberculosis* pelo menos a isoniazida (INH) e rifampicina (RIF), e 3,5% dos novos casos e 18% dos casos tratados anteriormente teriam TB-MDR/TB-RR. Entre os casos de TB-MDR, foi estimado que 8,5% teriam TB extensivamente resistente a medicamentos (TB-XDR), resistência do *M. tuberculosis* a RIF e INH, mais resistência a fluoroquinolona e um dos três fármacos injetáveis de segunda linha, sendo eles, amicacina, kanamicina ou capreomicina. A porcentagem de novos casos de TB-MDR/TB-RR está representada na Figura 2 (WHO, 2018).



**Figura 2.** Porcentagem de novos casos de TB-MDR/ TB-RR. Fonte: WHO, 2018.

O Brasil está entre os 30 países listados com alta carga de TB, esses países são responsáveis por cerca de 90% dos casos de TB estimados no mundo (WHO, 2018). Em 2016, foram diagnosticados e registrados 66.796 casos novos e 12.809 casos de retratamento de TB. No período de 2007 a 2016, o coeficiente de incidência da doença apresentou uma variação média anual de -1,7%, passando de 37,9/100 mil hab. para 32,4/100 mil hab. (BRASIL, 2017). O percentual de abandono foi de 10,3%, duas vezes acima da meta preconizada pela OMS que deve ser <5,0% (BRASIL, 2018).

Apesar dos exames laboratoriais para o diagnóstico da TB serem disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), em 2016, apenas 71,6% dos casos novos foram confirmados por critério laboratorial. O critério clínico para o diagnóstico da doença deve ser utilizado excepcionalmente nas situações em que as amostras não forem positivas para nenhum dos testes realizados TRM-TB/Teste Rápido Molecular para TB, baciloscopia ou cultura (BRASIL, 2017).

Em 2017, foram notificados 69.569 casos novos, com coeficiente de incidência de 33,5 casos/100 mil hab. e foram registrados 13.347 casos de retratamento, sendo equivalentes a 16,1% do total de casos notificados no mesmo período. No país, 71,4% dos casos novos de TB realizaram diagnóstico por confirmação laboratorial. Foram registrados 4.426 óbitos por TB em 2016, um coeficiente de mortalidade igual a 2,1 óbitos/100 mil hab., apresentando queda média anual de 2,0% de 2007 a 2016 (BRASIL, 2018).

No diagnóstico da TB pulmonar, duas importantes falhas foram evidenciadas: o baixo percentual de realização de cultura de escarro (33,6%) e a baixa proporção de realização de teste de sensibilidade (TS) (50,0%). Assim, destaca-se a importância da realização do TS em cultura de amostras clínicas positivas, a fim de que haja o diagnóstico precoce da TB-MDR (BRASIL, 2017). As principais preocupações no fenômeno de multirresistência estão associadas à possibilidade de disseminação de isolados TB-MDR, assim como pelas dificuldades de se estabelecer esquemas terapêuticos eficazes e efetivos (Melo *et al.*, 2003).

Em Minas Gerais foram notificados 3.343 casos novos de TB em 2017, desses 545 foram registrados em Belo Horizonte, apresentando o coeficiente de incidência de 15,8/100 mil hab. e 1,3/100 mil hab. de mortalidade. Dentre os pacientes detectados como caso novo para TB pulmonar, 67,3% dos contatos desses pacientes tiveram confirmação laboratorial para TB (BRASIL, 2018).

Em Belo Horizonte a incidência de casos novos é de 21,6/100 mil hab., sendo que desses 84,7% apresentam confirmação laboratorial. Dentre os casos de retratamento para TB apenas 24,1% realizaram a cultura de escarro e 46,7% o TS (BRASIL, 2018). Em 2016, foram diagnosticados 1.044 casos com resistência aos fármacos para TB, tais resultados foram obtidos pelo TRM-TB ou pelo TS. Desses, 700 foram registrados como caso novo e 344 como retratamento (BRASIL, 2017). Devido à realização de número insuficiente de cultura e TS, existe a possibilidade da TB-MDR estar subestimada (Augusto *et al.*, 2013).

De modo geral, bactérias e micobactérias, possuem mecanismos de resistência intrínseca, assim como mecanismos que conferem tolerância para minimizar o efeito prejudicial de moléculas tóxicas, incluindo antimicrobianos (Nguyen *et al.*, 2009). Um exemplo desse mecanismo é o efluxo ou bomba de efluxo, que age sinergicamente com a permeabilidade celular reduzida, (Nguyen *et al.*, 2009; Srivastava *et al.*, 2010; Louw *et al.*, 2009) expulsando substâncias tóxicas geradas dentro da célula, seja por processos metabólicos ou atividade enzimática. Algumas enzimas específicas são capazes de modificar moléculas tóxicas em derivados não tóxicos, reduzindo efetivamente sua concentração (Nguyen *et al.*, 2009). Ao contrário da resistência intrínseca aos fármacos, a resistência pode evoluir pela seleção natural, tal resistência pode ser definida como uma diminuição significativa na sensibilidade em uma determinada bactéria a um determinado fármaco, quando comparada com isolados sensíveis que nunca foram expostas ao fármaco (WHO, 2009).

O desenvolvimento de resistência aos fármacos no *M. tuberculosis* ocorre por um processo de mutação cromossômica espontânea (Bottger *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2006), sendo a detecção dessas mutações a base de muitos testes de genotipagem (Bernard *et al.*, 2008; Van Deun *et al.*, 2010). Mutações simples incluem substituições de bases ou mudanças de estrutura (inserção ou deleção de nucleotídeos) e ocorrem devido à taxa de erro intrínseca da replicação do DNA e à modificação espontânea ou química da base nucleotídica. Enquanto na maioria dos casos essas mutações são prejudiciais ao organismo, elas podem conferir uma vantagem seletiva na presença de certos fármacos, permitindo que os mutantes superem os do tipo selvagem. Portanto, quando mutantes espontâneos de *M. tuberculosis* em um paciente são expostos a um determinado agente, aqueles que abrigam mutações que conferem resistência tornam-se as populações predominantes (Johnson *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009).

As mutações conhecidas de resistência aos fármacos em *M. tuberculosis* estão localizadas principalmente nos alvos dos antimicrobianos, nas enzimas que ativam ou desativam esses fármacos ou nas regiões promotoras dos genes (Johnson *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009; Sandgren *et al.*, 2009). Existe uma fração de mutações clínicas e resistentes *in vitro* que não possui estas mutações clássicas, sugerindo que outros mecanismos conhecidos, como a bomba de efluxo, também podem conferir resistência. Isto é justificado pelas diferenças observadas no nível de resistência a um fármaco particular (expresso em concentração inibitória mínima) de isolados que abrigam as mesmas mutações (Louw *et al.*, 2009). Pode-se supor que outras mutações que conferem resistência desconhecida agem aumentando a eficiência de qualquer um dos mecanismos de resistência intrínseca discutidos acima.

Do ponto de vista clínico, a TB resistente aos fármacos pode surgir em um paciente por meio de dois mecanismos distintos. Pode ser adquirido por uma estirpe de *M. tuberculosis* anteriormente sensível a fármacos num dado paciente devido ao tratamento inadequado ou não adesão do paciente. A resistência aos fármacos pode ser definida como resistência primária se um dado paciente for infectado por uma cepa já resistente. Inicialmente, a resistência aos medicamentos surge pela aquisição de resistência, e os pacientes que desenvolvem TB resistente ao fármaco podem, então, disseminar isolados resistentes para outros indivíduos (Jassal *et al.*, 2009). Os fatores de risco da TB, tais como, tabagismo, alcoolismo, história de uso de drogas, índice de massa corporal baixo, diabetes mellitus, vírus da hepatite C (HCV), HIV/aids e depressão (Hermosilla *et al.*, 2017) são alguns fatores que estão associados com o

abandono do tratamento, uso irregular e disseminação da TB.

A dificuldade em detectar resistência pode levar a um tratamento inadequado e a falha terapêutica e como consequência aumentar a disseminação de bactérias resistentes, o que pode gerar a heterorresistência, que é definida como a coexistência de organismos sensíveis e resistentes aos fármacos em um mesmo indivíduo, sendo considerada a etapa preliminar para a resistência total (Hofmann-Thiel *et al.*, 2009).

O diagnóstico precoce da heterorresistência pode ser essencial para evitar o surgimento de populações totalmente resistentes, porém, a heterorresistência em isolados clínicos é de difícil detecção (Zhang *et al.*, 2014). Nos últimos anos, vários métodos genotípicos estão disponíveis para detectar mutações que conferem resistência. No entanto, pouco se conhece da sensibilidade destes métodos para detectar a heterorresistência. (Folkvardsen *et al.*, 2013).

Em relação às infecções mistas, essas são definidas como diferentes isolados do *M. tuberculosis*, identificado pela presença de mais de um alelo em mais de um *loci* no mesmo isolado e heterogeneidade clonal pela presença de mais de um alelo em um único *locus*, que pode ser detectado pelo *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable Number Tandem Repeat* (MIRU-VNTR) (Cohen *et al.*, 2010; Dickman *et al.*, 2010; Stavrum *et al.* 2009; Cohen *et al.*, 2012). As infecções mistas facilitam a disseminação de isolados resistentes e aumentam a chance da falha do tratamento (Cohen *et al.*, 2010; van Rie *et al.*, 2005). Portanto, é possível detectar mais de um isolado de *M. tuberculosis* no paciente, e essa situação vem acontecendo com mais frequência do que o esperado, e já foram descritas desde 1975 (Lazzarini *et al.*, 2012; Mankiewicz *et al.*, 1975).

A identificação de infecções mistas e de heterorresistência pode impedir que haja diagnóstico errôneo, tratamento inadequado e falha terapêutica (Hanekom *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014; van Rie *et al.*, 2005).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

A rápida emergência de isolados TB-MDR e TB-XDR representa uma série de ameaças ao tratamento da doença. O diagnóstico precoce da heterorresistência pode ser essencial para evitar o surgimento de populações totalmente resistentes, principalmente porque a heterorresistência em isolados clínicos é subestimada.

Na infecção mista, o grande desafio é detectar a presença de diferentes isolados do *M. tuberculosis*, sendo uma das causas da falha no tratamento da TB.

Portanto, a identificação do melhor método genotípico para detectar a heterorresistência e a caracterização da infecção mista em *M. tuberculosis* é de fundamental importância para auxiliar no controle dos pacientes com maior probabilidade de recidiva e falência, proporcionando a mudança do esquema de tratamento, maior taxa de cura e diminuição da disseminação de isolados resistentes.

## 2.0 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho de diferentes métodos genotípicos na detecção da heterorresistência do *M. tuberculosis* a rifampicina, isoniazida e multidroga resistente e relacionar com infecção mista ou heterogeneidade clonal.

### 2.2 Objetivos específicos

- Detectar a heterorresistência por meio das técnicas moleculares: GenoType MTBDR<sub>plus</sub><sup>®</sup> e sequenciamento de Sanger.
- Caracterizar a infecção mista e heterogeneidade clonal em isolados clínicos com heterorresistência por meio da técnica MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat*) 24 loci.
- Descrever as características sociodemográficas e clínicas (sexo, idade, escolaridade, raioX, histórico de tuberculose e comorbidades) dos pacientes com presença de isolados heterorresistentes.

### **3.0 METODOLOGIA DETALHADA**

#### **3.1 Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG sob o parecer 122.941 (CAAE 06611912.8.0000.5149) como parte do projeto intitulado “Avaliação da Concentração inibitória mínima (MIC) de cepas do *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e resistentes isoladas em Minas Gerais” sendo autorizada a utilização dos isolados para estudo genético.

#### **3.2 Delineamento e local do estudo**

Trata-se de um estudo de conveniência utilizando 654 isolados pulmonares positivas para TB. Cada isolado correspondia a um paciente. Desses, 520 eram sensíveis e 134 resistentes, e desses, 29 apresentaram heterorresistência à rifampicina e/ou isoniazida. Os isolados eram provenientes do Hospital de Referência Terciária Hospital Júlia Kubitschek (HJK), Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) que é um hospital de alta complexidade e da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Centro de referência do Estado de Minas Gerais, no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2017.

As culturas foram neutralizadas no Laboratório de Pesquisa em Micobactérias da Faculdade de Medicina (LPM/FM) da UFMG e as técnicas moleculares realizadas no Laboratório de Saúde Pública e Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da (LSPBM/FF) da UFMG.

Foi definida como heterorresistência a coexistência de isolados sensíveis e resistentes, como infecção mista duas estirpes diferentes e heterogeneidade clonal mesma estirpe com isolados sensíveis e resistentes, em um mesmo indivíduo.

Os dados clínicos foram coletados por meio do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e Sistema de Informação de Tratamentos Especiais da Tuberculose (SITE-TB).

#### **3.3 Critérios de Inclusão**

Isolados clínicos do *M. tuberculosis* viáveis em cultivo.

#### **3.4 Critérios de Exclusão**

Isolados clínicos sem Teste de Sensibilidade.

Micobactérias Não Tuberculosas (MNT).

Quantidade de DNA insuficiente para todas as técnicas.

### **3.5 Isolamento Micobacteriano**

Os isolados estocados na Faculdade de Medicina da UFMG provenientes de amostras clínicas pulmonares foram previamente identificadas e testadas quanto à sensibilidade aos fármacos de primeira linha para o tratamento da TB: estreptomicina (S), isoniazida (INH), rifampicina (RIF) e etambutol (E) por meio do método das proporções em BACTEC™ MGIT™ 960 system (Becton Dickinson®) (Siddiqi & Rüsç-Gerdes, 2006), no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais (LACEN-MG) do Instituto Octávio Magalhães da FUNED.

### **3.6 Extração de DNA**

A extração de DNA foi feita utilizando o kit GenoLyse®. Foram coletadas duas alçadas do crescimento bacteriano do Lowenstein Jensen (LJ) e transferido para um microtubo que foram ressuspensos com 100 µl de tampão de lise (A-LYS) e incubado a 95°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 100 µl de tampão de neutralização (A-NB), a solução foi vortexada e centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante, que equivale ao DNA extraído foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C. (Hain, 2015)

### **3.7 Verificação da presença de DNA extraído**

Os DNA foram processados no LSPBM/FF/UFMG, onde foi realizada corrida em gel de agarose a 1% em TBE (Tris/Ácido Bórico/EDTA) e adicionado 5 µL de DNA extraído em cada canaleta a 120 Volts por 45 minutos para verificar presença de bandas. Os DNA também foram dosados em espectrofotômetro SpectraMax® utilizando-se 2 µL de DNA.

### **3.8 Técnicas moleculares para detecção da heterorresistência**

#### **3.8.1 Genotype MTBDRplus®**

O teste GenoType MTBDRplus® (Hain Lifescience, Nehren, Alemanha) é baseado na extração de DNA utilizando o kit GenoLyse. A amplificação multiplex ocorre com *primers* biotinilados presentes na solução de AM-A e AM-B utilizadas na amplificação do DNA. A hibridização reversa ocorre com a tecnologia DNA-Strip®. Inicia-se com a incubação de 20µL do DNA amplificado e 20µL de DEN por 5 minutos

na DNA-Strip<sup>®</sup> na *strip*, em seguida adiciona-se 1mL de HYB e colocar a DNA-Strip e deixar incubado por 30 minutos a 45°C no *Twin-Cubator*. Aspirar o HYB completamente, adicionar 1mL de STR e incubar por 15 minutos a 45°C. Remove-se completamente o STR, adiciona-se 1mL de RIN e incubar por 1 minuto à temperatura ambiente. Em seguida remover o RIN e adicionar 1mL da solução de conjugado e incubar por 30 minutos à temperatura ambiente. Retira-se o conjugado e fazer duas lavagens com 1mL de RIN por 1 minuto à temperatura ambiente, em seguida lavar com 1mL de água. Após remover a água, adicionar 1mL da solução de substrato e incubar por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação parar a reação lavando duas vezes com 1mL de água por 1 minuto. Remover a DNA-Strip<sup>®</sup> do poço, secar com papel absorvente e colar na folha de trabalho para interpretação dos resultados. Os códons e suas respectivas mutações podem ser vistas na Tabela 1. As resistências à isoniazida e à rifampicina são detectadas, por ausência de sinal numa sonda do tipo selvagem e/ou no aparecimento de sinal numa sonda mutante (Hain, 2015) e a heterorresistência é detectada quando aparece simultaneamente o sinal WT e uma sonda de mutação.

**Tabela 1. Mutações dos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* detectados pelo GenoType MTBDRplus®**

	<b>Códon</b>		<b>Mutação</b>
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-512		L511P
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L Q513P del 514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y Del 515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		Del 518 N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A	H526Y
		<i>rpoB</i> MUT2B	H526D H526R H526P H526Q H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531Q S531W L533P
	<b>Códon</b>		<b>Mutação</b>
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2
	<b>Códon</b>		<b>Mutação</b>
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T8A

### 3.8.2 Sequenciamento de Sanger

O sequenciamento das regiões *hotspot* dos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* (Tabela 2) foi realizado de acordo com Silva *et al.* (2003) e Dalla Costa *et al.* (2009). Os volumes necessários foram calculados para cada MIX da PCR utilizando-se as soluções nas seguintes concentrações: tampão 10x, MgCl<sub>2</sub> 50μM, dNTP 2,5 μM, primer *forward* 20pmol e primer *reverse* 20pmol, água para completar o volume e por último a Taq 5U, sendo o volume final de cada reação 49μL. A cada solução de MIX foi adicionada DNA na concentração de 90 nanogramas. Após a preparação do MIX o material foi colocado no termociclador Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cyclers<sup>®</sup> com as condições de amplificação específica para cada gene. Para verificar a amplificação dos DNA, foi corrido gel de agarose a 1,5% durante por uma hora a 120V. Após este período o gel foi fotografado sob a luz UV no transluminador UVP. Posteriormente foi realizada a purificação dos DNA amplificados utilizando PEG8000 (*Polyethylene Glicol* 8000) mantido em estufa a 37°C por 15 minutos e centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi aspirado e descartado e em seguida foram adicionados 50 μL de etanol a 70%, homogeneizado por inversão e centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e os tubos abertos foram secos em estufa a 37°C por 25 minutos e repousados (*overnight*). Após o período de *overnight* foram ressuspensos com 20μL de água ultrapura em cada tubo, mantidos em estufa a 37°C por 30 minutos, homogeneizados em vórtex e armazenados a -20°C até a realização da PCR do *Big Dye* que utiliza-se tampão do Kit *Big Dye*, *Big Dye* v3.1, primer *forward* 5pmol ou primer *reverse* 5pmol, água para completar o volume, sendo o volume final de cada reação 9μL e 1μL do DNA amplificado e purificado e levado ao termociclador com as condições de amplificação específica para cada gene. A precipitação foi realizada com 40 μL com isopropanol a 65% em cada poço, homogeneizados em vórtex e mantidos a temperatura ambiente protegido da luz por 15 minutos. Foram centrifugados a 4680rpm por 35 minutos e o sobrenadante foi desprezado por inversão. Foi realizado um *spin* invertido sobre papel absorvente na centrífuga de placas e em seguida adicionados 100μL de etanol a 60% e centrifugados a 4680 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi novamente desprezado, e realizado novo *spin* invertido sobre papel absorvente na centrífuga de placas. A placa foi secada em termociclador com a tampa aberta a 94°C por 5 minutos e armazenados *overnight* a -20°C. Para ressuspender e desnaturar a placa foi adicionado 10μL de formamida Hi-

Di<sup>TM</sup> e mantido a temperatura ambiente protegida da luz por 30 minutos, em seguida homogeneizados em vórtex, novo *spin* na centrífuga de placas e a placa foi desnaturada a 95°C por 5 minutos e imediatamente colocada no gelo para choque térmico e mantida assim até a aplicação no analisador genético.

**Tabela 2. Lista dos *primers* referentes à técnica Sequenciamento de Sanger**

<i>Primer</i>	<i>Sequência do primer</i>
<i>rpoB</i> Fw	5'GGTCGCCGCGATCAAGGAGT 3'
<i>rpoB</i> Rv	5'TGCACGTCGCGGACCTCCA 3'
<i>katG</i> Fw	5'CATGAACGACGTCGAAACAG 3'
<i>katG</i> Rv	5'CGAGGAAACTGTTGTCCCAT 3'
<i>inhA</i> Fw	5'CCTCGCTGCCCAGAAAGGGA 3'
<i>inhA</i> Rv	5'ATCCCCCGGTTTCCTCCGGT 3'

*Primers* descritos previamente (Silva *et al.*; 2003).

### 3.9 Caracterização da infecção mista dos isolados heterorresistentes

#### 3.9.1 MIRU-VNTR 24 loci

A padronização do MIRU-VNTR utilizada nesse trabalho foi baseada em 24 *loci* (Tabela 3) utilizando-se método manual. Como controle foi utilizado a cepa H37Rv (Supply *et al.*, 2006). Para cada reação foram calculados os volumes necessários para elaboração do MIX da PCR utilizando-se as soluções nas seguintes concentrações: tampão 10x, MgCl<sub>2</sub> 50µM, dNTP 25 µM, primer *forward* 25pmol e primer *reverse* 25pmol, água para completar o volume e por último a Taq 5U, sendo o volume final de cada reação 45µL. A cada solução de MIX foram adicionados 5µL de DNA. Após este procedimento o material foi colocado no termociclador com as condições de amplificação específica para cada *locus* MIRU-VNTR. No final da reação, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 2% por duas horas e trinta minutos a 110V. Após este período, o gel foi fotografado sob a luz UV no transluminador. Foi realizada, posteriormente, a medida de peso molecular para cada amostra e comparada com a tabela de repetição de cada MIRU, obtendo-se valores numéricos para cada amostra. As informações do MIRU-VNTR foram digitalizadas e analisadas pelo site livre SITVITWEB website [http://www.pasteu-guadeloupe.fr:8081/SITVIT\\_ONLINE/](http://www.pasteu-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/).

**Tabela 3. Lista dos primers referentes à técnica 24 loci MIRU-VNTR**

<i>Primer</i>	<i>Sequência do Primer</i>
ETR_A-Fw	5'ATTTTCGATCGGGATGTTGAT3'
ETR_A-Rv	5'TCGGTCCCATCACCTTCTTA3'
ETR_B-Fw	5'GCCAACACCAGGACAGCATCATG3'
ETR_B-Rv	5'GGCATGCCGGTGATCGAGTGG3'
ETR_C-Fw	5'GACTTCAATGCGTTGTTGGA3'
ETR_C-Rv	5'GTCTTGACCTCCACGAGTGC3'
MIRU 2- Fw	5'TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT3'
MIRU 2-Rv	5'TACTCGGACGCCGGCTCAAAT3'
MIRU 4-Fw	5'GCGCGAGAGCCCGAACTGC3'
MIRU 4-Rv	5'GCGCAGCAGAAACGTCAGC3'
MIRU 10- Fw	5'GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC3'
MIRU 10-Rv	5'GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT3'
MIRU 16- Fw	5'TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA3'
MIRU 16-Rv	5'CCCGTTCGTGCAGCCCTGGTAC3'

MIRU 20- Fw	5'TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG3'
MIRU 20-Rv	5'GGAGACCGCGACCAGGTAAGTGT3'
MIRU 23- Fw	5'CAGCGAAACGAACTGTGCTATCAC3'
MIRU 23-Rv	5'CGTGTCCGAGCAGAAAAGGGTAT3'
MIRU 24- Fw	5'CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT3'
MIRU 24-Rv	5'GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA3'
MIRU 26- Fw	5'CCCGCCTTCGAAACGTCGCT3'
MIRU 26-Rv	5'TGGACATAGGCGACCAGGCCAATA3'
MIRU 27- Fw	5'TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA3'
MIRU 27-Rv	5'GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA3'
MIRU 31- Fw	5'CTGATTGGCTTCATACGGCTTTA3'
MIRU 31-Rv	5'GTGCCGACGTGGTCTTGAT3'
MIRU 39- Fw	5'CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC3'
MIRU 39-Rv	5'CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT3'
MIRU 40- Fw	5'GGGTTGCTGGATGACAACGTGT3'
MIRU 40-Rv	5'GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA3'
Mtub 04- Fw	5'GTCCAGGTTGCAAGAGATGG3'
Mtub 04-Rv	5'GGCATCCTCAACAACGGTAG3'
Mtub 21- Fw	5'AGATCCCAGTTGTCGTCGTC3'
Mtub 21-Rv	5'CAACATCGCCTGGTTCTGTA3'
Mtub 29- Fw	5'AACCCATGTCAGCCAGGTTA3'
Mtub 29-Rv	5'ATGATGGCACACCCGAAGAAC3'
Mtub 30- Fw	5'AGTCACCTTTCCTACCACTCGTAAC3'
Mtub 30-Rv	5'ATTAGTAGGGCACTAGCACCTCAAG3'
Mtub 34- Fw	5'GCAGATAACCCGCAGGAATA3'
Mtub 34-Rv	5'GGAGAGGATACGTGGATTTGAG3'
Mtub 39- Fw	5'AATCACGGTAACTGGGTTGTTT3'
Mtub 39-Rv	5'GATGCATGTTTCGACCCGTAG3'
Qub 11a- Fw	5'TTCAGGGGGGATCCGGGA3'
Qub 11a-Rv	5'CCCATCCCGCTTAGCACATTCGTA3'
Qub 11b- Fw	5'CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG3'
Qub 11b-Rv	5'CGAAGTGAATGGTGGTGGCAT3'
Qub 26- Fw	5'GGCCAGGTCCTTCCCGAT3'
Qub 26-Rv	5'AACGCTCAGCTGTCGGAT3'
Qub 4156- Fw	5'CTGGTTCGCTACGCATCGTG3'
Qub 4156-Rv	5'TGGTGGTTCGACTTGCCGTCGTTGG3'

*Primers* descritos previamente (Supply *et al.*, 2006)

#### 4.0 NOTA EXPLICATIVA

Seguindo as orientações do Programa de Pós-Graduação Ciências em Saúde: Infectologia e Medicina Tropical os resultados e discussões serão apresentados em formato de artigo. Como pré-requisito para a defesa de dissertação do mestrado esta deve conter pelo menos um artigo a ser submetido para revista indexada.

O artigo será enviado para *International Journal of Infectious Disease* (Classificada como Qualis B1/Medicina II) intitulado:

“Detecção de isolados de *M. tuberculosis* heteroresistentes, provenientes de pacientes do estado de MG, Brasil.”

**Detecção de isolados de *M. tuberculosis* heteroresistentes, provenientes de pacientes do estado de MG, Brasil**

Lida Jouca de Assis Figueredo<sup>a</sup>, Isabela Neves de Almeida<sup>a</sup>, Valéria Martins Soares<sup>a</sup>, Philip Noel Suffys<sup>b</sup>, Wânia da Silva Carvalho<sup>c</sup>, Silvana Spíndola de Miranda<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Pesquisa em Micobactérias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil;

<sup>b</sup>Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>c</sup>Laboratório de Saúde Pública e Biologia Molecular, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar diferentes métodos genotípicos para detecção e caracterização de heterorresistência do *Mycobacterium tuberculosis* aos fármacos rifampicina e isoniazida.

**Métodos:** O GenoType MTBDR*plus*<sup>®</sup> e o sequenciamento dos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* foram utilizados na detecção da heterorresistência. A caracterização de infecção mista e a heterogeneidade clonal dos isolados heterorresistentes foi realizada por meio do *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable Number Tandem Repeat* (MIRU-VNTR).

**Resultado:** Dos 654 isolados, 134 eram resistentes, sendo 29 heterorresistentes à rifampicina e/ou isoniazida. O GenoType MTBDR*plus*<sup>®</sup> detectou a heterorresistência em 26/29 (89,7%) no *rpoB*, 5/29 (17,2%) no *katG* e 2/29 (6,9%) no *inhA*, sendo três isolados concomitantes tanto no *rpoB* quanto no *katG*. Em um isolado a heterorresistência estava presente nos três genes. O sequenciamento detectou a heterorresistência em 7/29 (24,1%) no *rpoB*, 3/29 (10,3%) no *katG* e nenhuma no *inhA*. Em um isolado, a heterorresistência foi concomitante nos genes *rpoB* e *katG*. O MIRU-VNTR detectou infecção mista em três isolados heterorresistentes, sendo 2/3 Ugandal/Haarlem e 1/3 LAM/Ugandal e quatro apresentaram heterogeneidade clonal da linhagem LAM.

**Conclusão:** O GenoType MTBDR*plus*<sup>®</sup> foi método genotípico que mais detectou a heterorresistência, o MIRU-VNTR demonstrou infecção mista e heterogeneidade clonal.

**Palavras-Chave:** Tuberculose Multidroga Resistente (MDR-TB), *Mycobacterium tuberculosis*, heterorresistência, infecção mista.

## Introdução

Em 2017, a incidência da tuberculose (TB) no mundo foi de 133/100 mil habitantes, sendo que 558 mil desenvolveram TB resistente à rifampicina (RR-TB), e destes, 82% eram TB multidroga resistente (TB-MDR). Em 3,5% dos novos casos de TB e 18% dos casos de retratamento eram TB-MDR/TB-RR [1].

Em 2016, no Brasil foram diagnosticados 1.044 casos com resistência, desses, 700 foram registrados como casos novos e 344 como retratamento. Considerando-se apenas os casos novos e que iniciaram o tratamento para TB resistente, 177 (23,5%) eram de monorresistência, 330 (43,9%) de resistência à RIF pelo Teste Rápido Molecular (TRM-TB), 49 (6,5%) de polirresistência, 193 (25,7%) de multirresistência e 3 (0,3%) não tinham informação [2].

Vários fatores podem estar relacionados com desfechos desfavoráveis de pacientes com TB, tal como o abandono ou não adesão ao tratamento. Dentre outros fatores estão *diabetes mellitus*, aspectos psicossociais do tabagismo, uso de álcool e drogas ilícitas, predominância do sexo masculino e ao menor nível socioeconômico das populações [3,4].

Em alguns casos, a rápida resistência adquirida pode ser causada pelo diagnóstico e tratamento incorreto ou heterorresistência que é a coexistência das bactérias sensíveis e resistentes no mesmo paciente [5]. Além da dificuldade do diagnóstico e tratamento, a detecção pelo teste de sensibilidade fenotípico no estágio preliminar à resistência total é ainda mais difícil [6]. Existem dois mecanismos que explicam a heterorresistência, a infecção mista e a divisão de uma única linhagem em clones sensíveis e resistentes devido à evolução biológica (heterogeneidade clonal) [7].

Foi evidenciado anteriormente que infecções mistas, particularmente nos casos em que os isolados coinfectantes exibem heterorresistência nos padrões de sensibilidade aos fármacos, têm impacto negativo no resultado do tratamento [8].

O diagnóstico de infecção mista é trabalhoso, uma vez que requer que as linhagens de colônias sejam identificadas individualmente a partir da cultura original [9].

A identificação da heterorresistência do *M. tuberculosis* é subestimada e por isso tem sido descrito o uso do GenoType MTBDRplus® e do sequenciamento de Sanger como métodos genotípicos que podem auxiliar na sua detecção [10], e o MIRU-VNTR na detecção de infecção mista e heterogeneidade clonal.

O objetivo desse estudo foi avaliar diferentes métodos genotípicos para detecção da heterorresistência do *Mycobacterium tuberculosis* aos fármacos rifampicina e isoniazida.

## **Métodos**

### *Desenho do estudo*

Foram selecionadas 654 isolados de conveniência. Cada isolado correspondia a um paciente. Esses eram provenientes de amostras pulmonares de pacientes diagnosticados com TB no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2017. Os isolados foram encaminhados para realização do teste de sensibilidade (TS) pelo sistema BACTEC™ MGIT™ 960 system (MGIT™) (Becton Dickinson®), no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais (LACEN-MG) do Instituto Octávio Magalhães da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

Os isolados eram provenientes do Hospital de Referência Terciária Hospital Júlia Kubitschek (HJK), Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) que é um hospital de alta complexidade e da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Centro de referência do Estado de Minas Gerais, no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2017.

### *Extração de DNA*

O DNA genômico do *M. tuberculosis* utilizado para todas as técnicas foi extraído de colônias subcultivadas em meio sólido Lowenstein-Jensen utilizando o GenoLyse® e, seguindo as orientações do fabricante [11].

### *Características sociodemográficas e perfil clínico*

Os dados sociodemográficos, clínicos, radiológicos e história de tratamento foram obtidos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e Sistema de Informação de Tratamentos Especiais da Tuberculose (SITE-TB).

### *GenoType MTBDRplus®*

Foram utilizados 5µL do DNA extraído pelo GenoLyse<sup>®</sup> junto com Master mix para amplificação por meio da PCR multiplex. A hibridação reversa na DNA *strip* foi realizada conforme recomendado pelo fabricante.

Para detectar a sensibilidade aos fármacos foi definida como sensível a hibridização (presença da banda) para todas as sondas *wild-type* (WT) e sem hibridização (ausência de banda) para sondas mutantes. A ausência de hibridização na WT e/ou hibridização de qualquer sonda mutante indicou resistência ao respectivo fármaco. A hibridização na WT e nos genes mutantes indicou heterorresistência ou infecção mista. As mutações ocorrem em códons específicos dos genes *rpoB*, *katG* e *inhA*.

#### *Sequenciamento de Sanger*

O sequenciamento das regiões *Hotspot* dos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* foi realizado utilizando os *primers* conforme Tabela 1.

**Tabela 1.** *Primers* do Sequenciamento

<i>rpoB</i> Fw	5'GGTCGCCGCGATCAAGGAGT 3'
<i>rpoB</i> Rv	5'TGCACGTCGCGGACCTCCA 3'
<i>katG</i> Fw	5'CATGAACGACGTCGAAACAG 3'
<i>katG</i> Rv	5'CGAGGAAACTGTTGTCCCAT 3'
<i>inhA</i> Fw	5'CCTCGCTGCCAGAAAGGGA 3'
<i>inhA</i> Rv	5'ATCCCCGGTTTCCTCCGGT 3'

A mistura da PCR foi tampão 10x, MgCl<sub>2</sub> 50µM, dNTP 2,5 µM, primer *forward* 20pmol e primer *reverse* 20pmol, Taq 5U e 1µL de DNA. Para a purificação dos DNA amplificado foi utilizado PEG8000 (*Polyethylene Glicol* 8000) e posteriormente PCR do *Big Dye* que utilizou tampão do Kit *Big Dye*, *Big Dye* v3.1, primer *forward* ou *reverse* a 5pmol e 1µL do amplicon purificado e amplificado [12,13]. Os resultados do sequenciamento foram analisados usando o software SeqScape<sup>®</sup>.

Quando o sequenciamento apresentou pico duplo, ou seja, um pico de WT e outro pico de base mutante associados ao códon de resistência, foi considerado heterorresistência.

### *Tipagem do M. tuberculosis*

A tipagem molecular do *M. tuberculosis* foi baseado em 24 diferentes *loci* contendo *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR) do *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit* (MIRU) em fragmentos gerados por meio de PCR monoplex [14] que foi realizada nos 29 isolados heterorresistentes. Os produtos foram separados por gel de agarose e os tamanhos dos fragmentos foram analisados manualmente de acordo com o peso molecular de cada isolado, verificando a presença de dois alelos em dois ou mais *loci*.

### *Considerações Éticas*

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais sob o parecer 122.941 (CAAE 06611912.8.0000.5149).

## **Resultados**

### *Teste de sensibilidade fenotípico e genotípico*

#### Teste de Sensibilidade por meio do MGIT 960

Do total, 530/654 (81%) isolados do *M. tuberculosis* eram sensíveis a RIF e INH e 124/654 (19%) resistentes. Dentre os resistentes, 110/124 (88,7%) eram TB-MDR e 14/124 (11,3%) resistentes somente a INH.

#### GenoType MTBDR<sup>plus</sup>®

Do total, 520/654 (79,5%) isolados do *M. tuberculosis* apresentavam WT e, portanto, eram consideradas sensíveis e 134/654 (20,5%) apresentaram mutações, sendo consideradas resistentes. Dentre as resistentes, 96/134 (71,7%) eram TB-MDR, 21/134 (15,6%) eram resistentes somente INH e 17/134 (12,7%) eram resistente somente RIF (Tabela 2).

A concordância Kappa entre os métodos, sendo o Teste de Sensibilidade o método padrão, o valor de Kappa para rifampicina foi de 0,93 (muito bom) e para isoniazida a concordância foi de 0,66 (bom).

**Tabela. 2** Resultado fenotípico e genotípico (n=134)

Sensibilidade	Teste de Sensibilidade – MGIT 960	GenoType MTBDRplus®
RIF <sub>R</sub> , INH <sub>R</sub>	110 (82,1%)	96 (71,7%)
RIF <sub>S</sub> , INH <sub>R</sub>	14 (10,4%)	21 (15,6%)
RIF <sub>R</sub> , INH <sub>S</sub>	0 (0,0%)	17 (12,7%)
RIF <sub>S</sub> , INH <sub>S</sub>	10 (7,5%)	0 (0,0 %)

RIF<sub>R</sub>: resistência à rifampicina; RIF<sub>S</sub>: sensível à rifampicina; INH<sub>R</sub>: resistência à isoniazida; INH<sub>S</sub>: sensível à isoniazida.

*Heterorresistência detectada pelo teste GenoType MTBDRplus®*

Cento e trinta e quatro isolados eram resistentes pelo método genotípico e tiveram mutações detectadas pelo GenoType MTBDRplus®, destes 113/134 (84,3%) apresentaram mutações no gene *rpoB* relacionadas a resistência a RIF e 117/134 (87,3%) apresentaram resistência a INH, sendo 106/117 (90,6%) relacionadas a mutações no gene *katG*, 36/117 (30,8%) no gene *inhA* e em 25/117 (21,4%) concomitantemente nos genes *katG* e *inhA*.

Em 29/134 (21.6%) foi evidenciado a heterorresistência pelo GenoType MTBDRplus® para RIF e/ou INH (25/29 MDR e 4/29 sensíveis pelo MGIT 960). (Tabela 2). Não foi identificada heterorresistência em isolados com monorresistência a RIF ou INH pelo TS.

Dos 29 isolados, a heterorresistência à RIF foi identificada em 26/29 (89,7%) mutações nos códons 531 e 526 do gene *rpoB* e à INH em 8/29 (27,6%), sendo 6/8 (75%) no códon 315 do gene *katG* e 2/8 (25%) no códon C15T do gene *inhA*. Em três isolados a heterorresistência ocorreu concomitantemente nos genes *rpoB* e *katG* e em um isolado nos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Heterorresistência pelo GenoType MTBDRplus®

Gene	Sonda WT	Sonda mutante	Códon	Isolados MDR	Isolados Sensíveis	n total
<i>rpoB</i>	WT	MUT3	S531L	21	2	23
	WT	MUT2A	H526Y	2	0	2
	WT	MUT2B	H526D	0	1	1
<i>KatG</i>	WT	MUT1	S315T1	3	3	6
<i>inhA</i>	WT	MUT1	C15T	1	1	2

*Heterorresistência detectada por sequenciamento de DNA*

No sequenciamento a heterorresistência foi detectada em 10/29 (34,5%) isolados. A heterorresistência na RIF foi evidenciada em 7/29 (24,1%) isolados com mutações nos códons 531 e 522 do gene *rpoB* e a heterorresistência relacionada a INH em 4/29 (13,8%) isolados com mutações no gene *katG* nos códons 315, 299 e 293. Nenhum isolado apresentou heterorresistência com mutação no gene *inhA* (Tabela 4). Em um isolado a heterorresistência foi concomitante nos genes *rpoB* e *katG*.

**Tabela 4.** Heterorresistência pelo sequenciamento de DNA

Gene	Códon	Isolados MDR	Isolados Sensíveis	n total
<i>rpoB</i>	531	5	1	6
	522	0	1	1
<i>katG</i>	315	1	1	2
	299	1	0	1
	293	1	0	1
<i>inhA</i>	----	----	----	----

### Caracterização da heterorresistência do *M. tuberculosis*

Dos 29 isolados heterorresistentes a RIF e/ou INH ocorreram infecção mista com diferentes linhagens do *M. tuberculosis* ou heterogeneidade clonal em 7/29 (24,1%).

Foram detectados três isolados heterorresistentes que apresentaram dois alelos distintos em dois ou mais *loci* sugerindo a presença de duas linhagens diferentes e quatro com heterogeneidade clonal que apresentaram dois alelos distintos em apenas um *locus* (Tabela 5).

**Tabela 5.** Caracterização da heterorresistência pelo MIRU-VNTR

Isolado	MIRU 2	MIRU 4	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40	ETRA	ETR B	ETR C	MTUB 4	MTUB 21	MTUB 29	MTUB 30	MTUB 34	MTUB 39	QUB 11b	QUB 26	QUB 4156
1	2	3	4	3	x	5	x	5	3	3	6	2	3	2	5	3	3+4	4+5	1+5	3	2+3	2	6	x
2	2	3	3	1	x	5	x	5	3	2	6	2	2	2	5	3	2+3	4	2+1	3	3+2	4	5	x
3	2	3	3	0	x	6	x	4	2	3	6	1	2+1	1	5	0	3	4	1	3	2+3	4	9	x
4	2	3'	4	3	x	6	x	5	3	2	6	9	2	2	5	4	3+2	4	1	3	2	2	6	x
5	2	3	3	2+0	x	2	x	2	3	3	6	4	2	2	4	3	2	3	2	3	2	2	6	x
6	2	3	3	2+0	x	2	x	2	2	3	6	1	2	2	4	3	3	4	1	3	3	3	5	x
7	2	3	3	2+3	x	5	x	5	2	2	6	2	1	1	4	3	3	4	1	3	3	4	6	x

Ao avaliar os resultados do MIRU-VNTR e os dados clínicos dos pacientes com infecção mista, todos pacientes eram portadores de TB-MDR, sendo que 1/3 deles não tinham histórico de tratamento prévio e 2/3 tinham histórico de abandono. Dentre os isolados com heterogeneidade clonal, 2/4 eram TB-MDR, 2/4 eram sensíveis e 3/4 tinham histórico de abandono (Tabela 6).

**Tabela 6.** Caracterização de infecção mista e heterogeneidade clonal

Caracterização	Isolado	Variação <i>locus</i> (n)	MIRU-VNTR	Desfecho	MGIT 960
<b>Infecção Mista</b>	1	4	Ugandal/Haarlem	Abandono	TB-MDR
	2	3	Ugandal/Haarlem	Abandono	TB-MDR
	3	2	LAM/Ugandal	Cura	TB-MDR
<b>Heterogeneidade clonal</b>	4	1	LAM	Abandono	TB-MDR
	5	1	LAM	Abandono	TB-MDR
	6	1	LAM	Abandono	Sensível

7	1	LAM	Cura	Sensível
---	---	-----	------	----------

LAM: Latin-American-Mediterranean; TS: Teste de Sensibilidade; TB-MDR:

Tuberculose Multidroga Resistente

### 3.3. Características sociodemográficas e clínicas

Dos pacientes que apresentaram isolados com heterorresistência, 23/29 (79.3%) eram do sexo masculino, 17/29 (58.6%) da raça/cor negra e a média de idade de 44,9 anos e 17 possuíam algum grau de escolaridade. No Raio X de tórax foram evidenciadas lesões cavitárias em 21/29 (72,4%) e 25/29 (86,2%) apresentaram tratamento prévio para tuberculose (Tabela 7).

**Tabela 7:** Características sociodemográficas e clínicas

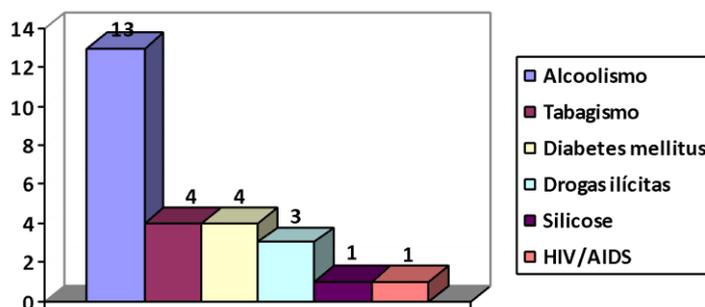
Variáveis		N	%
Sexo	Masculino	23	79,3
	Feminino	6	20,7
Idade	18 – 29	2	6,9
	30 – 39	9	31
	40 – 49	6	20,7
	50 – 59	6	20,7
	60 – 69	0	0
	70 – 79	2	6,9
	Ignorado	4	13,8
Escolaridade	Não frequentou escola	5	17,2
	Até 3 anos	2	6,9
	4-7 anos	6	20,7
	8-11 anos	2	6,9
	> 11 anos	2	6,9
	Ignorado	12	41,4

Raio X	Lesões cavitárias	21	72,4
	Suspeito	4	13,8
	Ignorado	4	13,8
Histórico de TB	Tratamento prévio	25	86,2
	Sem tratamento prévio	2	6,9
	Ignorado	2	6,9

Suspeito: Infiltrado em lobo (s) superior (es) e/ou segmento apical do lobo inferior

As comorbidades estavam presentes em 16/29 (55,1%) pacientes, dentre esses, o alcoolismo foi predominante em 13/16 (81,3%). (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Comorbidades dos pacientes com isolados heterorresistentes



O uso dos diversos fármacos dos pacientes que apresentaram isolados heterorresistentes e o desfecho final até o momento do estudo está demonstrado na Tabela 8. Houve mudança de tratamento em 25/29 (86,2%) e 4/29 (13,8%) os dados eram desconhecidos.

**Tabela 8.** Esquema de tratamento e desfecho (n=29)

Variáveis		n	%
Mudança de esquema	Sim	25	86,2
	Ignorado	4	13,8
Esquema de tratamento	AM E LFX TRZ Z	6	20,7

	E LFX S TRD Z	4	13,8
	AM E LFX TRD	2	6,9
	CM E LFX TRD Z	2	6,9
	AM CFZ LZD MFX PAS Z	2	6,9
	AM E OFX TRD	1	3,4
	AM E ET OFX TRD	1	3,4
	E OFX S TRD Z	1	3,4
	CFZ CM E ET LFX PAS TRD Z	1	3,4
	CM E ET LFX PAS TRD Z	1	3,4
	CFZ CM LZD MFX PAS	1	3,4
	Não avaliado	7	24,1
<hr/>			
Desfecho Final	Cura	15	51,7
	Abandono	5	17,2
	Óbito por TB	3	10,3
	Em tratamento	2	6,9
	Óbito não TB	1	3,4
	Ignorado	3	10,3

Legenda: AM: amicacina; E: etambutol; LFX: levofloxacina; TRD: terizidona; Z: pirazinamida; OFX: ofloxacina; ET: etionamida; S: estreptomicina; CFZ: clofazemina; CM: capreomicina; PAS: ácido *p*-aminosalicílico; LZD:linezolida; MFX:moxifloxacina

## Discussão

### *Teste de sensibilidade fenotípico e genotípico*

Nesse estudo, os resultados discordantes encontrados entre os testes fenotípicos e genotípicos (MGIT 960 resistente e GenoType MTBDR*plus*<sup>®</sup> sensível), podem ser devido a mutações em regiões que não estavam cobertas pelas sondas no GenoType MTBDR*plus*<sup>®</sup>. Esse resultado corrobora com outro trabalho [15].

Em relação aos resultados discordantes (MGIT 960 sensível e GenoType MTBDRplus<sup>®</sup> resistente), esses podem ser explicados pela heterorresistência, refletindo a evolução lenta das bactérias de um perfil sensível ao resistente, o que não é incomum no *M. tuberculosis* [16]. Também pode ter ocorrido a transmissão de bactérias sensíveis e resistentes de pacientes que não aderiram ao tratamento. Esses pacientes tendem a abrigar micobactérias em proporções genotipicamente detectáveis, mas fenotipicamente indetectáveis [5]. A menor proporção de bactérias resistentes do que sensíveis podem ser detectadas pelo GenoType MTBDRplus<sup>®</sup> e ter baixa detecção pelo MGIT 960 [17,18].

#### *Heterorresistência pelo GenoType MTBDRplus<sup>®</sup> e Sequenciamento*

A investigação molecular em 134 isolados do *M. tuberculosis* identificou a heterorresistência em 29 (21,7%) utilizando GenoType MTBDRplus<sup>®</sup> e em 10 (7,5%) por meio do sequenciamento de Sanger. A proporção de heterorresistência neste estudo é semelhante ao conduzido no Uzbequistão [5].

Nesse trabalho, o GenoType MTBDRplus<sup>®</sup> apresentou melhor desempenho como em outro estudo que demonstrou que para a heterorresistência ser detectada por meio do sequenciamento, são necessários que o mesmo isolado contenha 50% micobactérias sensíveis e 50% resistentes, enquanto para o GenoType MTBDRplus<sup>®</sup> a proporção de micobactérias é de 95% sensíveis e 5% resistentes [10].

Na detecção da heterorresistência, o GenoType MTBDRplus<sup>®</sup> apresentou ausência de determinadas sondas que são detectadas pelo sequenciamento, como demonstrado nesse estudo, que o sequenciamento detectou heterorresistência no códon 522 para o gene *rpoB* e nos códons 293 e 299 no gene *katG*, sendo então necessário a incorporação de sondas adicionais [19].

Quando detectado heterorresistência no GenoType MTBDRplus<sup>®</sup> ou no sequenciamento a escolha do esquema adequado é complexa pois não se sabe exatamente qual a proporção de *M. tuberculosis* sensíveis ou resistentes, pois dependendo do caso ainda pode ser usado fármacos de primeira linha. Assim é necessário a interpretação dos dados genotípicos juntamente com os dados clínicos do paciente [20], levando em consideração os locais das mutações que estão relacionadas com baixo ou moderado nível de resistência por meio da concentração inibitória mínima (ex: códon 516 do *rpoB* e códon C15T do *inhA*) [21].

### *Caracterização da heterorresistência do *M. tuberculosis**

A heterorresistência devido a infecção por isolados únicas (heterogeneidade clonal) ocorre devido a segregação de organismos sensíveis e resistentes, sendo descritos numerosos relatos sobre a pressão seletiva em tratamentos inadequados [22]. No nosso estudo foi demonstrado que a maioria dos pacientes tinha o histórico de abandono e vários tratamentos prévios.

A presença de bactérias exclusivamente sensíveis que desenvolvem resistência durante o tratamento, com eliminação incompleta da população sensível [23] pode explicar a maior ocorrência de infecção mista entre isolados de diferentes linhagens. O MIRU-VNTR é uma ferramenta para avaliar se infecções mistas contribuíram para a heterorresistência [20]. Nesse estudo, foi possível detectar tanto infecção mista como heterogeneidade clonal, conforme apresentado na tabela 6.

### *Características sociodemográficas e clínicas*

As características sociodemográficas dos pacientes com isolados heterorresistentes consistem predominantemente em pessoas do sexo masculino, com a média de idade de 44,9 anos e baixo nível de escolaridade, o que é um fator associado ao abandono, por aumentar a vulnerabilidade à TB refletindo o acesso desigual a informação, benefícios oriundos de conhecimentos e serviços de saúde [24,25]

Dos pacientes que apresentaram isolados heterorresistentes com alteração radiológica com cavitação (72,4%) se justifica, pois, dentro de cavitações encontram-se micobactérias sensíveis e resistentes [26]. Os que apresentaram comorbidades 16/29 (55,1%), o alcoolismo foi predominante. O uso abusivo do álcool influencia tanto na evolução clínica quanto nos desfechos de abandono [27,28]. O histórico de TB desses pacientes é preocupante, pois esses tiveram vários tratamentos prévios com desfecho desfavorável como descrito pela OMS em relação a pacientes com TB-MDR [1].

O GenoType MTBDR<sup>plus</sup>® foi o método genotípico que mais detectou a heterorresistência e o MIRU-VNTR demonstrou infecção mista e heterogeneidade clonal.

### **Agradecimentos**

Agradecemos a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ 03266-13/APQ 00094-12) e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq 446796/2014 e 310174/2017-7). Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia

da Faculdade de Medicina da UFMG. A CAPES pelo auxílio e fomento desse trabalho.  
A Fundação Ezequiel Dias (FUNED). A Rede Brasileira de Tuberculose – REDE TB.

## Referências

1. World Health Organization. 2018. Global tuberculosis control: WHO report 2018. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
2. BRASIL. MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.
3. Silva DR, Muñoz-Torrico M, Duarte R, Galvão T, Bonini EH, Arbex FF, Arbex MA, Augusto VM, Rabahi MF, Mello FCQ. Fatores de risco para tuberculose: diabetes, tabagismo, álcool e uso de outras drogas. **J Bras Pneumol.** 2018;44(2):145-152.
4. Cherkaoui I, Sabouni R, Ghali I, Kizub D, Billioux AC, Bennani K, et al. Treatment default amongst patients with tuberculosis in urban Morocco: predicting and explaining default and post-default sputum smear and drug susceptibility results. **PLoS One.** 2014;9(4):93574.
5. Hofmann-Thiel, S., J. van Ingen, K. Feldmann, L. Turaev, G. T. Uzakova, G. 347 Murmusaeva, D. van Soolingen, and H. Hoffmann. 2008. Mechanisms of heteroresistance 348 to isoniazid and rifampin of *Mycobacterium tuberculosis* in Tashkent, Uzbekistan. **Eur Respir.** 33:368-374.
6. Kumar, P., V. Balooni, B. K. Sharma, V. Kapil, K. S. Sachdeva, and S. Singh. 2014. High degree of multi-drug resistance and hetero-resistance in pulmonary TB patients from Punjab state of India. **Tuberculosis.** 94:73-80.
7. Z. Zhang, Y. Wang, Y. Pang, C. Liu. Comparison of Different Drug Susceptibility Test Methods To Detect Rifampin Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother** 2014; 58: 5632–5635
8. Cohen, T., P. D. van Helden, D. Wilson, C. Colijn, M. M. McLaughlin, I. Abubakar, and 305 R. M. Warren. 2012. Mixed-strain *Mycobacterium tuberculosis* infections and the 306 implications for tuberculosis treatment and control. **Clin Microbiol Rev.** 25:708-719.
9. Lazzarini LCO, Rosenfeld J, Huard RC, Hill V, Lapa e Silva JR, DeSalle R, Rastogi N, Ho JL. 2012. *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes that may

- derive from mixed strain infections are revealed by a novel computational approach. **Infect Genet Evol** 12:798 – 806.
10. D.B. Folkvardsen, VØ. Thomsen, L. Rigouts, E.M. Rasmussen, D. Bang, G. Bernaerts, J. Werngren, J.C. Toro, S. Hoffner, D. Hillemann, E. Svenssona. Rifampin Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* Cultures as Detected by Phenotypic and Genotypic Drug Susceptibility Test Methods. **J. Clin. Microbiol.** 2013; 51: 4220 – 4222
  11. Manual de instrução da fita Genotype MTBDR<sup>plus</sup>® versão 2.0, Hain, 2015
  12. Silva M, Senna S, Ribeiro M, Valim A, Telles MA, Kritski A, Morlock GP, Cooksey RC, Zaha A, Rossetti ML 2003. Mutations in *katG*, *inhA* and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol** 41: 4471-4474
  13. Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, et al. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. **BMC Microbiol.** 2009;9
  14. Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** 44,4498–4510.
  15. Lacombe A, Garcia-Sierra N, Prat C, Ruiz-Manzano J, Haba L, Roses S, Maldonado J, Dominguez J: GenoType MTBDRplus assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples. **J Clin Microbiol** 2008, 46:3660-3667.
  16. Rinder H, Mieskes KT, Löscher T: Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J Tuberc Lung Dis** 2001, 5:339-345.
  17. Traore H, Ogwang S, Mallard K, Joloba ML, Mumbowa F, Narayan K, Kayes S, Jones-Lopez EC, Smith PG, Ellner JJ, Mugerwa RD, Eisenach KD, McNerney R: Low-cost rapid detection of rifampicin resistant tuberculosis using bacteriophage in Kampala, Uganda. **Ann Clin Microbiol Antimicrob** 2007, 6:1-6.
  18. Ma X, Wang H, Deng Y, Liu Z, Xu Y, Pan X, Musser JM, Graviss EA: *rpoB* gene mutations and molecular characterization of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Shandong Province, China. **J Clin Microbiol** 2006, 44:3409-3412.

19. Bolotin S, Alexander DC, Chedore P, Drews SJ, Jamieson F: Molecular characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ontario, Canada. **J Antimicrob Chemother** 2009, 64:263-266.
20. Monica Prem Tolani, Desiree Therese Blossom D'souza and Nerges Furdoon Mistry. Drug resistance mutations and heteroresistance detected using the GenoType MTBDR*plus* assay and their implication for treatment outcomes in patients from Mumbai, India. I. **BMC Infectious Diseases** 2012, 12:9
21. Böttger EC. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: molecular mechanisms and laboratory susceptibility testing. In: DONALD, P.R.; VAN HELDEN, P.D. (Ed.). **Antituberculosis Chemotherapy. Progress in Respiratory Research. Basel: Karger.** 2001; 40: 128–144.
22. Woodford N, Ellington MJ. The emergence of antibiotic resistance by mutation. **Clin Microbiol Infect** 2006;13:5–18.
23. Colijn C, Cohen T, Ganesh A, Murray M: Spontaneous Emergence of Multiple Drug Resistance in Tuberculosis before and during Therapy. **PloS ONE** 2011, 6(3):e18327.
24. Silva CCAV; Andrade MS; Cardoso MD. Factors associated with tuberculosis treatment default in individuals monitored in health reference units of the city of Recife, Pernambuco State, Brazil, from 2005 to 2010. **Epidemiol. Serv. Saúde** v.22 n.1 Brasília mar. 2013
25. San Pedro A, Oliveira RM. Tuberculose e indicadores socioeconômicos: revisão sistemática da literatura. **Rev Panam Salud Publica.** 2013;33(4):294–301.
26. Kempker RR, Rabin AS, Nikolaishvili K, Kalandadze I, Gogishvili S, Blumberg HM, Vashakidze S. Additional drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from resected cavities among patients with multidrug-resistant or extensively drug-resistant pulmonary tuberculosis. **Clin Infect Dis** 2012;54:e51–e54.
27. Andrade RLP, Villa TCS, Pillon S. The influence of alcoholism in tuberculosis prognosis and treatment. SMAD, **Rev. Eletrônica Saúde Mental Álcool Drog.** (Ed. port.) v.1 n.1 Ribeirão Preto fev. 2005
28. Silva DR, Muñoz-Torrico M, Duarte R, Galvão T, Bonini EH, Arbex FF, Arbex MA, Augusto VM, Rabahi MF, Mello FCQ. Fatores de risco para tuberculose: diabetes, tabagismo, álcool e uso de outras drogas. **J Bras Pneumol.** 2018;44(2):145-152

## 5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização das diferentes técnicas demonstrou peculiaridades que influenciaram diretamente na realização dos trabalhos para a obtenção dos resultados.

O MIRU-VNTR é trabalhoso, pois é necessário realizar 24 PCR de alvos específicos para cada isolado e necessita de software de alto custo para análise dos dados.

No método do sequenciamento de DNA foi necessário treinamento em laboratório de referência no CDCT- Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico no Rio Grande do Sul. É uma técnica que possui insumos laboratoriais de alto custo e é realizado manualmente, sem a utilização de kits. Para a interpretação também é necessário software de alto custo.

O GenoType MTBDR*plus*<sup>®</sup> é uma técnica de fácil manuseio, uma vez que é um Kit padronizado, com reagentes colorimétricos e a interpretação dos resultados é feita manualmente.

A experiência adquirida com pesquisadores renomados em genética micobacteriana possibilitou aprendizado, colaboração e uma maior interação entre os grupos de Pesquisa em Micobactéria da UFMG e o CDCT.

## 6.0 PERSPECTIVAS

Realizar a concentração inibitória mínima a INH e a RIF dos isolados heterorresistentes.

Separar os isolados heterorresistentes que apresentaram infecção mista em meio 7H10 para realização de IS6110 e spoligotyping para avaliar *clusters*.

Sequenciar por meio do *Whole Genome Sequencing* os isolados heterorresistentes.

Identificar a heterorresistência em rotina principalmente em isolados sensíveis por meio do GenoType MTBDR*plus*<sup>®</sup>.

Realizar método de proporção em LJ dos isolados heterorresistentes para verificação de proporção de resistentes.

## 7.0 REFERÊNCIAS

AUGUSTO, C.J. *et al.* Characteristics of tuberculosis in the state of Minas Gerais, Brazil: 2002-2009. **J Bras Pneumol.** 2013; 3: 357-364.

Bernard M, Allbert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosiman ME: Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. **Am J Respir Crit Care Med.** 2008; 177(7):787-92.

Bottger EC, Springer B: Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. **Eur J pediatr.** 2008; 167:141-148.

BRASIL. MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Implantação do plano Nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública no Brasil: primeiros passos rumo ao alcance das metas. Brasília: Ministério da Saúde; 2018.

BRASIL. MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

Cohen, T., D. Wilson, K. Wallengren, E. Y. Samuel, and M. Murray. Mixed-strain *Mycobacterium tuberculosis* infections among patients dying in a hospital in KwaZulu-Natal, South Africa. **J Clin Microbiol.** 2010; 49:385-388.

Cohen, T., P. D. van Helden, D. Wilson, C. Colijn, M. M. McLaughlin, I. Abubakar, and 305 R. M. Warren. Mixed-strain *Mycobacterium tuberculosis* infections and the 306 implications for tuberculosis treatment and control. **Clin Microbiol Rev.** 2012; 25:708-719.

Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype

families from tuberculosis prevalent countries in South America. **BMC Microbiol.** 2009; 9.

Dickman, K. R., L. Nabyonga, D. P. Kateete, F. A. Katabazi, B. B. Asimwe, H. K. Mayanja, A. Okwera, C. Whalen, and M. L. Joloba. Detection of multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* using MIRU-VNTR in patients with pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda. **BMC Infect Dis.** 2010; 10:349.

D.B. Folkvardsen, VØ. Thomsen, L. Rigouts, E.M. Rasmussen, D. Bang, G. Bernaerts, J. Werngren, J.C. Toro, S. Hoffner, D. Hillemann, E. Svensson. Rifampin Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* Cultures as Detected by Phenotypic and Genotypic Drug Susceptibility Test Methods. **J. Clin. Microbiol.** 2013; 51: 4220 – 4222.

Hanekom, M., E. M. Streicher, D. Van de Berg, H. Cox, C. McDermid, M. Bosman, N. C. Gey van Pittius, T. C. Victor, M. Kidd, D. van Soolingen, P. D. van Helden, and R. M. Warren. Population structure of mixed *Mycobacterium tuberculosis* infection is strain genotype and culture medium dependent. **PLoS One.** 2013; 8:e70178.

Hermosilla S, You P, Aifah A, Abildayev T, Akilzhanova A, Kozhamkulov U. Identifying risk factors associated with smear positivity of pulmonary tuberculosis in Kazakhstan. **PLoS One.** 2017; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172942>.

Jassal M, Bishai WR: Extensively drug-resistant tuberculosis. **Lancet Infect Dis.** 2009; 9:19-30.

Johnson R, Streicher EM, Louw GE, Warren RM, van Helden PD, Victor TC: Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr Issues Mol Biol.** 2006; 8:97-111.

Kumar, P., V. Balooni, B. K. Sharma, V. Kapil, K. S. Sachdeva, and S. Singh. High degree of multi-drug resistance and hetero-resistance in pulmonary TB patients from Punjab state of India. **Tuberculosis.** 2014; 94:73-80.

Lazzarini, L. C. O., J. Rosenfeld, R. C. Huard, V. Hill, J. R. Lapa e Silva, R. DeSalle, N. Rastogi, and J. L. Ho. *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes that may derive from

mixed strain infections are revealed by a novel computational approach. **Infect Genet Evol.** 2012; 12:798-806.

Louw GE, Warren RM, Gey van Pittius NC, McEvoy CR, van Helden PD, Victor TC: A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** 2009; 53: 3181-3189.

Mankiewicz, E., and M. Liivak. Phage types of *Mycobacterium tuberculosis* in cultures isolated from Eskimo patients. **Am Rev Respir Dis.** 1975; 111: 307-312.

Manual de instrução da fita Genotype MTBDR<sup>plus</sup>® versão 2.0, Hain, 2015.

MELO, F.A.F. *et al.* Aspectos epidemiológicos da tuberculose multirresistente em service de referência na cidade de São Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2003; 36: 27-34.

Nguyen L, Pieters J: Mycobacterial subversion of chemotherapeutic reagentes and host defense tactics: challenges in tuberculosis drug development. **Annu Ver Pharmacol Toxicol.** 2009; 49:427-453.

Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB: Tuberculosis Drug resistance mutation database. **PLoS Med.** 2009; 6:e2.

Srivastava S, Musuka S, Sherman C, Meek C, Leff R, Gumbo T: Efflux-pump-derived multiple drug resistance to etambutol monotherapy in *Mycobacterium tuberculosis* and the pharmacokinetics and pharmacodynamics of etambutol. **J Infect Dis.** 2010; 201:1225-1231.

Stavrum, R., M. Mphahlele, K. Ovreas, T. Muthivhi, P. B. Fourie, K. Weyer, and H. M. S. Grewal. High diversity of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in South Africa and preponderance of mixed infections among ST53 isolates. **J Clin Microbiol.** 2009; 47:1848-1856.

Siddiqi SH, Rüsç-Gerdes S. MGIT<sup>TM</sup> PROCEDURE MANUAL. FindDiagnostics 2006.

Silva M, Senna S, Ribeiro M, Valim A, Telles MA, Kritski A, Morlock GP, Cooksey RC, Zaha A, Rossetti ML. Mutations in *katG*, *inhA* and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** 2003; 41:4471-4474.

Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** 2006; 44:4498–4510.

S. Hofmann-Thiel, J. van Ingen, K. Feldmann, L. Turaev, G.T. Uzakova, G. Murmusaeva, D. van Soolingen, H. Hoffmann. Mechanisms of heteroresistance to isoniazid and rifampin of *Mycobacterium tuberculosis* in Tashkent, Uzbekistan. **Eur Respir J.** 2009; 33: 368–374.

Van Deun A, Martin A, Palomino JC: Diagnosis of drug-resistant tuberculosis: reliability and rapidity of detection. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2010; 14:131-140.

van Rie, A., T. C. Victor, M. Richardson, R. Johnson, G. D. van der Spuy, E. J. Murray, N. Beyers, N. C. G. van Pittius, P. D. van Helden, and R. M. Warren. 2005. Reinfection and mixed infection cause changing *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance patterns. **Am J Respir Crit Care Med.** 2005; 172:636-642.

World Health Organization: Guidelines for Surveillance of Drug Resistance in Tuberculosis. Geneva, WHO, 2009.

World Health Organization. 2018. Global tuberculosis control: WHO report 2018. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Zhang Y, Yew WW: Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2009; 13:1320-1330.

Z. Zhang, Y. Wang, Y. Pang, C. Liu. Comparison of Different Drug Susceptibility Test Methods To Detect Rifampin Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2014; 58: 5632–5635.

## 8.0 ANEXOS

### 8.1 Anexo A – Folha de Aprovação no Comitê de Ética



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

## 8.2 Anexo B – Folha de Aprovação do Mestrado

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL	<b>UFMG</b>
---	---	-------------

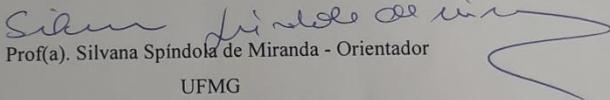
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

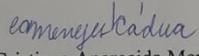
**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS GENOTÍPICOS NA DETECÇÃO DE  
HETERORESISTÊNCIA EM PACIENTES COM TUBERCULOSE  
EVALUATION OF GENOTYPIC METHODS IN THE DETECTION OF  
HETERORESISTANCE IN PATIENTS WITH TUBERCULOSIS**

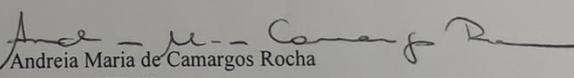
**LIDA JOUCA DE ASSIS FIGUEREDO**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, área de concentração INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

Aprovada em 20 de dezembro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Silvana Spíndola de Miranda - Orientador  
UFMG

  
Prof(a). Cristiane Aparecida Menezes de Padua  
UFMG

  
Prof(a) Andreia Maria de Camargos Rocha  
UFMG

Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2018.