



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Flávia Alvim Dutra de Freitas

**Perfil genético por sequenciamento e genotipagem de cepas  
multirresistentes e sensíveis do *Mycobacterium tuberculosis*  
provenientes de diversos estados brasileiros**

Rio de Janeiro  
2013

Flávia Alvim Dutra de Freitas

**Perfil genético por sequenciamento e genotipagem de cepas multirresistentes e sensíveis do *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de diversos estados brasileiros**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F866 Freitas, Flávia Alvim Dutra de.

Perfil genético por sequenciamento e genotipagem de cepas multirresistentes e sensíveis do *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de diversos estados brasileiros / Flávia Alvim Dutra de Freitas – 2013.

137 f.

Orientador: Rodolpho Mattos Albano.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. *Mycobacterium tuberculosis* - Teses. 2. Isoniazida - Teses. 3. Rifampicina - Teses. 4. Mutação (Biologia) - Teses. I. Albano, Rodolpho Mattos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616-002.5

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Flávia Alvim Dutra de Freitas

**Perfil genético por sequenciamento e genotipagem de cepas multirresistentes do  
*Mycobacterium tuberculosis* provenientes de diversos estados brasileiros**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de novembro de 2013.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano (Orientador)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Paula D' Alincourt Carvalho Assef  
Instituto Oswaldo Cruz

---

Prof. Dra. Cleonice Alves de Melo Bento  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2013

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Ednei Freitas e Maricy Alvim, pelo apoio eterno e incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (Universidade do Estado do Rio de Janeiro), ao Centro de Referência Professor Hélio Fraga (FIOCRUZ) e ao laboratório do Instituto de Genética e Microbiologia da Universidade Paris-Sud (Orsay, França), por possibilitarem a realização deste trabalho.

Ao Professor Rodolpho Mattos Albano, pela orientação, confiança atribuída e bagagem científica compartilhada.

Aos meus pais, Ednei Freitas e Maricy Alvim e ao meu irmão Guga por todo incentivo e amor.

Ao Rodolpho Mattos Albano pela amizade.

À Joana Hygino e Bruno Vilaça pelo imenso apoio.

Ao Zé Mario pelo incentivo, apoio e carinho eternos.

À Denise Neves, Maria Daniele e Denise Dias por deixarem a vida mais colorida.

Aos amigos queridos: Amanda Lima, Luís Fernando Bruno, Nina Pamplona, Márcio Valva, Fernanda Nunes e Nathalia Meireles pela amizade e carinho.

Aos queridos Fred e Alfi pelo imenso carinho nas horas mais difíceis.

Conscientizar-se da própria ignorância é um grande passo para aprender.

*Benjamin Disraeli*

## RESUMO

FREITAS, Flávia Alvim Dutra. **Perfil genético por sequenciamento e genotipagem de cepas multirresistentes e sensíveis do *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de diversos estados brasileiros**. 2013. 137 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Programa de Pós Graduação em Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A tuberculose multirresistente (MR) a drogas é uma séria ameaça à saúde pública devido à maiores complexidade, custo e efeitos colaterais do tratamento. Poucos estudos descreveram a epidemiologia molecular de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* MR no Brasil. Neste trabalho foi investigada a diversidade genética e mutações associadas à resistência a drogas de 99 isolados MR e 7 não MR coletados em um período de 8 anos e provenientes de 12 estados brasileiros. Esta investigação foi feita através da análise do polimorfismo de fragmentos de restrição do elemento de inserção *IS6110* (*IS6110*-RFLP), spoligotyping e sequenciamento de regiões dos genes *rpoB* e *katG* que conferem resistência aos antibióticos rifampicina e isoniazida, respectivamente. Mutações nos genes *katG* e *rpoB* foram encontradas em 90,9% e 93% dos isolados MR analisados, respectivamente. Para o gene *rpoB*, 91,9% das mutações estavam contidas na região RRDR de 81-pb. Um total de 51 (51.5%), 23 (23.3%) e 11 (11.1%) isolados MR apresentaram mutações nos códons 531, 526 e 516, respectivamente. Com relação ao gene *katG*, foram encontradas mutações em 93% dos isolados MR analisados, sendo que 7 apresentaram mutações apenas na primeira região analisada (*katG1*). O codon 315 da segunda região analisada do gene *katG* (*katG2*) apresentou mutações em 82.8% dos isolados MR, sendo a maioria Ser315Thr. A região *katG1* apresentou mutações em 30.3% dos isolados MR sendo a maioria deleção do códon 4. Pelo spoligotyping foi possível determinar que os isolados MR deste estudo pertencem a 5 diferentes famílias (com suas subfamílias) de *M. tuberculosis* circulantes no Brasil, onde as mais frequentemente encontradas foram: LAM (46%), T (17%) e H (12%). Nós observamos que uma das famílias, a EAI5, carrega mutações no códon 463 do gene *katG*, o que não ocorre para as demais. Além disso, entre nossos isolados foi identificada um isolado pertencente à cepa Beijing (extremamente virulenta), mas este fato não é alarmante já que se tratou de apenas um caso. Através de nossos dados foram descritos novos alelos mutados para os genes *rpoB* e *katG*. Com exceção da família X2, foi identificada uma região inicial do gene *katG* com alta frequência de mutações nos isolados MR. A análise por *IS6110*-RFLP revelou que 25 isolados formaram 11 grupos genotípicos enquanto 74 mostraram um padrão único de bandas. Esta alta taxa de polimorfismo indica aquisição independente de resistência entre nossos isolados. Para a família H, foi identificada uma inversão na frequência de ocorrência de mutações no gene *rpoB*, sendo o códon 516 o mais mutado, seguido pelo 526 e 531. Os resultados deste estudo fornecem informações úteis para um melhor entendimento do espectro de mutações dos isolados MR de pacientes no Brasil. Nossos resultados também se tornam úteis no desenvolvimento de testes diagnósticos de tuberculose MR e para auxiliar no rastreamento da transmissão global desta doença.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*. Isoniazida. Rifampicina. Spoligotyping. *IS6110*-RFLP.



## ABSTRACT

FREITAS, Flávia Alvim Dutra. **Genetic profile by sequencing and genotyping of multidrug resistant and sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* from several brazilian states**. 2013. 137 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Programa de Pós Graduação em Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Multidrug resistant (MR) tuberculosis is a major threat to public health due to the greater complexity, cost and side effects of treatment. Few studies have described the molecular epidemiology of MR *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Brazil. In this study, we investigated the genetic diversity and mutations associated with drug resistance of 99 MR and 7 non-MR isolates collected in a 8-year period from 12 Brazilian states. This investigation was performed by restriction fragment length polymorphism analysis of the IS6110 insertion element (IS6110-RFLP), spoligotyping and sequencing of the *rpoB* and *katG* genes that, when mutated, confer resistance to isoniazid and rifampin, respectively. Mutations in *rpoB* and *katG* were found in 90.9% and 93% of the MR isolates analyzed, respectively. For the *rpoB* gene, 91.9% of the mutations were found in the 81-bp RRDR region Fifty-one (51.5%), 23 (23.3%) and 11 (11.1%) MR isolates had mutations in codons 531, 526 and 516, respectively. In the *katG* gene, mutations were found in 93% of the MR isolates analyzed. Seven isolates had mutations only in the first region analyzed (*katG1*). Codon 315 of the second *katG* gene region analyzed (*katG2*) had mutations in 82.8% of the MR isolates, mostly being a Ser315Thr substitution. Mutations were found in 30.3% of the MR isolates in the *katG1* region and the majority was a codon 4 deletion. Spoligotyping detected 5 different *M. tuberculosis* families (with their subfamilies) in the MR isolates in this study. The most common were: LAM (46%), T (17%) and H (12%). We observed that one of the families, the EAI5, carries mutations in codon 463 of the *katG* gene, which does not occur for the other isolates. In addition, among our isolates we identified an isolate belonging to the Beijing family (highly virulent), but this fact is not alarming since this was only one case. We described new alleles for the *rpoB* and *katG* genes. With the exception of the X2 family, we identified an initial region of the *katG* gene with high frequency of mutations in the MR isolates. IS6110-RFLP analysis demonstrated that 25 isolates formed 11 genotypic groups while 74 showed a unique pattern of bands. This high rate of polymorphism indicates independent acquisition of resistance among our isolates. Concerning the H family, an inversion in the frequency of mutations occurred in the *rpoB* gene with codon 516 being the most mutated one followed by codons 526 and 531. The results of this study provide useful data for better understanding the spectrum of mutations of the MR isolates from patients in Brazil. Our results are also useful for the development of diagnostic tests for MR tuberculosis and to aid in tracking global transmission of this disease.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*. Isoniazid. Rifampin. Spoligotyping. IS6110-RFLP.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 1 –  | Número estimado de mortes, em adultos, devido à doenças infecciosas, no mundo (1997 à 2020*)..... | 17 |
| Figura 2 –  | Estimativa da taxa de incidência da tuberculose, 2011.....  | 19 |
| Figura 3 –  | Prevalência estimada de HIV em novos casos de tuberculose, 2011.....                              | 20 |
| Figura 4 –  | DOTS no mundo e no Brasil. Ano 2004.....  | 23 |
| Quadro 1 –  | Drogas antituberculosáticas e mecanismos de resistência à drogas.....                             | 25 |
| Figura 5 –  | Porcentagem de novos casos de tuberculose com MR, 2011.....                                       | 28 |
| Figura 6 –  | Porcentagem de casos de tuberculose com MR previamente tratados, 2011.....                        | 29 |
| Figura 7 –  | Estrutura química da isoniazida, da rifampicina, da pirazinamida e do etambutol.....              | 31 |
| Figura 8 –  | Sensibilidade à isoniazida.....   | 32 |
| Figura 9 –  | Resistência à Isoniazida.....   | 33 |
| Figura 10 – | Resistência à Rifampicina.....  | 35 |
| Figura 11 – | Mapa do Brasil mostrando os diferentes estados e o número de isolados por estado (99 MR).....     | 46 |
| Figura 12 – | Famílias (A) e subfamílias das principais famílias (B e C) determinadas Spoligotyping.....        | 58 |

## LISTA DE TABELAS

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Tabela 1 –  | Perfil de resistência para os 99 isolados MR analisados.....   | 43 |
| Tabela 2 –  | Perfil de resistência para cada um dos 99 isolados MR.....   | 44 |
| Tabela 3 –  | Perfil de mutação para os genes <i>rpoB</i> e <i>katG</i> encontrado nos 99 isolados MR analisados.....                                  | 48 |
| Tabela 4 –  | Perfil de mutação para os 99 isolados MR analisados.....   | 50 |
| Tabela 5 –  | Grupos genotípicos de IS6110-RFLP e suas mutações para os genes <i>rpoB</i> <i>katG</i> .....  | 56 |
| Tabela 6 –  | Dados demográficos e incidência da tuberculose em diferentes regiões Brasil.....   | 59 |
| Tabela 7 –  | Associações entre os grupos gerados através do IS6110-RFLP e Spoligotyping.....  | 60 |
| Tabela 8 –  | Grupos por IS6110-RFLP e seus respectivos Spoligotypings.....  | 63 |
| Tabela 9 –  | Associação entre famílias do spoligotyping e mutações nos genes <i>rpoB</i> e <i>ka</i> para os 99 isolados MR.....                      | 64 |
| Tabela 10 - | Subfamílias das duas famílias com maior número de ocorrências determinadas pelo spoligotyping e seus respectivos perfis mutacionais..... | 66 |
| Tabela 11 – | Padrão de resistência dos 7 isolados sensíveis à RMP analisados.....   | 67 |
| Tabela 12 – | Perfil de mutações para o gene <i>katG</i> encontradas nos 7 isolados sensíveis à RMP.....   | 67 |
| Tabela 13 – | Perfil de genotipagem encontrado para os 7 isolados sensíveis à RMP.....   | 68 |
| Tabela 14 - | Perfil de mutações encontradas para o estado de Goiás.....   | 78 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |   |
|---------------|---|
| AIDS          | Síndrome da imunodeficiência adquirida                |
| CRPHF         | Centro de Referência Professor Helio Fraga            |
| DOTS          | Tratamento diretamente observado de curta duração     |
| DR            | “Direct repeats”                                      |
| EMB           | Etambutol   |
| ET            | Etionamida  |
| HIV           | Vírus da imunodeficiência humana                      |
| INH           | Isoniazida  |
| IS            | Sequencia de inserção                                 |
| LJ            | Löenstein Jensen                                      |
| MR            | Multirresistência                                     |
| mRNA          | RNA mensageiro  |
| MS            | Ministério da Saúde                                   |
| OMS           | Organização Mundial da Saúde                          |
| pb            | Pares de base   |
| PCR           | Reação em cadeia da polimerase                        |
| PZA           | Pirazinamida  |
| RFLP          | Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição |
| RMP           | Rifampicina   |
| RRDR          | “Rifampicin resistance determining region”            |
| Spoligotyping | “Spacer Oligonucleotide typing”                       |
| ST            | Estreptomicina  |
| WHO           | World Health Organization                             |

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
|          | <b>INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>12</b> |
| <b>1</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>   | <b>14</b> |
| 1.1      | Tuberculose: Causa e locais de maior ocorrência.....  | 14        |
| 1.2      | Raio X do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....   | 15        |
| 1.3      | Epidemiologia da tuberculose.....   | 16        |
| 1.4      | Tratamento.....   | 21        |
| 1.5      | Multirresistência.....  | 24        |
| 1.6      | Resistência à Isoniazida.....   | 31        |
| 1.7      | Resistência à Rifampicina.....  | 34        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>   | <b>36</b> |
| 2.1      | Objetivo geral.....   | 36        |
| 2.2      | Objetivos específicos.....  | 36        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>37</b> |
| 3.1      | Isolados e teste de sensibilidade / identificação .....   | 37        |
| 3.2      | Culturas e extração do DNA .....  | 38        |
| 3.3      | Genotipagem por <i>IS6110</i> - RFLP.....   | 39        |
| 3.4      | Genotipagem por Spoligotyping Luminex® .....  | 39        |
| 3.5      | PCR e sequenciamento.....   | 40        |
| 3.6      | MabA-15 MAS-PCR.....  | 42        |
| 3.7      | Análise estatística.....  | 42        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>   | <b>69</b> |
|          | <b>CONCLUSÕES.....</b>  | <b>81</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>83</b> |
|          | <b>APÊNDICE</b> - Artigo submetido ao Journal of Antimicrobial<br>Chemotherapy em 13 de setembro de 2013..... | 94        |

## INTRODUÇÃO

A tuberculose, causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, é uma das doenças infecto-contagiosas que mais causam mortes em todo o mundo. A organização mundial da saúde (OMS) estimou 8,7 milhões de novos casos (13% co-infectados com HIV) e 1,4 milhões de óbitos devido à tuberculose para o ano de 2011, incluindo quase 1 milhão de mortes entre pacientes HIV negativos e aproximadamente 430 mil mortes entre pacientes HIV positivos. Segundo a OMS, a incidência da tuberculose em 2011 no Brasil foi entre 69 e 97 mil novos casos (OMS, 2012).

O tratamento padrão para novos casos de tuberculose é uma quimioterapia com rifampicina (RMP), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB) de seis meses de duração. Cada droga age sobre uma população específica do *M. tuberculosis* e, como no caso de outros antibióticos, a não adesão ao tratamento tem como consequência a seleção de organismos resistentes.

A maior preocupação com relação aos programas de controle da tuberculose é o desenvolvimento de resistência à drogas em cepas do *M. tuberculosis*. Ela pode surgir espontaneamente mas geralmente é causada pelo abandono do tratamento por parte do doente. A tuberculose multirresistente (MDR) é definida por resistência à RMP e INH, duas drogas extremamente importantes para o tratamento de primeira linha. Estas cepas resistentes não podem ser submetidas ao tratamento inicial padrão, sendo necessário que outras drogas sejam incluídas neste regime, aumentando consideravelmente o tempo e o custo do tratamento e suas reações adversas, além de mostrar taxa de cura bem menos elevada. Mundialmente, foram estimados para 2011, entre 460 e 790 mil casos de tuberculose MR (OMS, 2012).

As mutações genéticas responsáveis pela resistência à diferentes fármacos são alvo de diversos estudos. Mutações em genes específicos estão relacionadas à resistência para uma determinada droga. A resistência à RMP e INH, por exemplo, é geralmente devido à alterações nos genes *rpoB* e *katG*, respectivamente.

A transmissão de bacilos MR é uma séria ameaça à saúde pública. Portanto, torna-se essencial a rápida e eficiente detecção de resistência em cepas do *M. tuberculosis* para que o tratamento seja realizado com eficácia. Além disso, até o presente momento, pouco se sabe sobre as principais cepas circulantes em nosso

país e menos ainda sobre as cepas MR e suas associações com diferentes genótipos. Neste contexto, torna-se relevante uma investigação epidemiológica para um rastreamento e posterior controle das diferentes cepas de *M. tuberculosis* existentes no Brasil.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Tuberculose: causa e locais de maior ocorrência

A tuberculose é uma doença infecciosa que atinge principalmente os pulmões, embora também possa afetar outros órgãos. Esta doença acompanha a humanidade há milênios e é sensível à ação dos profissionais, o que representa, ao mesmo tempo, uma vantagem e uma grande responsabilidade para os agentes de saúde. Apesar desta doença ser mais bem controlada nos países mais desenvolvidos como EUA, Canadá, Japão e alguns países da Europa, ela ainda causa muitos problemas nos países em desenvolvimento, como no Brasil e principalmente na África, onde a epidemia de HIV/AIDS é associada à tuberculose, o que dificulta a erradicação da doença. Portanto, a tuberculose é uma doença geralmente associada à pobreza, ocorrendo preferencialmente em locais onde as condições de moradia são precárias e nos aglomerados urbanos, como favelas, presídios e comunidades (Brito *et al.*, 2004; Abrahão *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2007). Assim, esta doença acaba sendo negligenciada, se tornando uma ameaça à saúde pública. No entanto, não é correto afirmarmos que a tuberculose é uma doença apenas das classes desfavorecidas. Algumas doenças de base podem tornar populações de nível social mais alto suscetíveis ao *M. tuberculosis*, como o diabetes, insuficiências renais crônicas, transplantes, neoplasias, pacientes sob quimioterapia, alcoolismo, dietas de emagrecimento, depressão, atividades extenuantes e o próprio envelhecimento (Jansen *et al.*, 2012).

O *M. tuberculosis* também conhecido como bacilo de Koch, tem a forma reta ou ligeiramente curva, imóvel, não esporulado e não encapsulado. Ele é uma espécie aeróbia estrita, por isso, se multiplica facilmente no pulmão e em cavidades aéreas. Sua reprodução é lenta (14 a 20 horas), o que retarda tanto a evolução da doença quanto a eficácia da medicação. O *M. tuberculosis* é capaz de reprimir seu metabolismo e sua multiplicação, podendo permanecer latente por longos períodos, o que justifica a reativação da doença anos após a primeira infecção (Silveira, 2000).

A parede celular da micobactéria é complexa, com cerca de 60% de sua estrutura formada por ácidos graxos de cadeias longas e curtas que constituem os



ácidos micólicos (Ducati *et al.*, 2006). Esta característica, que lhe dá a propriedade de reter o corante carbo-fucsina na presença de álcool-ácido, lhe confere proteção e permite a sobrevivência e multiplicação dentro dos lisossomos do macrófago até que este seja ativado pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Yoshikai, 2006).

## 1.2 Raio X do *Mycobacterium tuberculosis*

O sequenciamento genômico da cepa H37Rv do *M. tuberculosis* foi completado em 1998, permitindo enorme avanço no conhecimento de sua biologia. O bacilo tem um cromossomo circular com 4.411.532 pares de base (pb), 4.043 genes que codificam 3.993 proteínas e conteúdo G + C de 65.6%. Nenhum plasmídeo foi identificado no *M. tuberculosis*, bem como em outras micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. microtii*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*). Cerca de 230 genes estão envolvidos no metabolismo lipídico. Dezessete por cento dos genes do *M. tuberculosis* codificam componentes da parede celular (Brodin *et al.*, 2005).

Cerca de 3,4 % do genoma do *M. tuberculosis* é constituído por seqüências de nucleotídeos denominadas seqüências de inserção (IS). A seqüência IS6110 possui 1.365 pares de base e é a mais importante, com o número de cópias variando de zero a mais de 25 por genoma. A caracterização destas inserções é feita por RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição) onde uma enzima de restrição corta o DNA em fragmentos de tamanhos variáveis que são separados em gel de agarose e transferidos para uma membrana. Os elementos IS6110 presentes nos diferentes fragmentos são visualizados radiograficamente por hibridização com uma cópia do IS6110 marcado. A análise por RFLP com o IS6110 provou ser um método conveniente e confiável para diferenciação de cepas de *M. tuberculosis* sendo considerado por muito tempo o método de “padrão-ouro” na tipagem molecular desse microorganismo, possuindo um alto poder discriminatório (van Embden, 1993).

O genoma do *M. tuberculosis* também apresenta uma região que contém cópias de seqüências com 36 nucleotídeos que se repetem entre 10 a 50 vezes,

denominadas *direct repeats* (DR). Elas são mais numerosas e mais confiáveis para análise quando as IS estão presentes em número inferior a cinco cópias. A determinação das DR baseia-se na técnica de PCR com oligonucleotídeos marcados, que é denominada *spoligotyping* (*spacer oligonucleotide typing*) (Cave *et al.*, 2005). A técnica de *spoligotyping* é uma tipagem molecular que torna possível a classificação das cepas de *M. tuberculosis* em determinadas famílias de acordo com o padrão encontrado, pois analisa uma região específica do complexo, o locus DR, pela determinação da presença ou ausência de espaçadores específicos entre as sequências DR. Esta técnica também facilita a diferenciação das espécies do complexo *M. tuberculosis* graças à existência de um banco de dados internacional que permite uma vasta comparação.

A virulência do bacilo influencia na agressividade da doença. A cepa com o genótipo Beijing, mais comum na China, Rússia e demais países asiáticos, é uma das mais virulentas no mundo e rapidamente adquire resistência aos medicamentos (Kubica *et al.*, 2005). A disseminação de cepas MR e de alta virulência representa uma séria ameaça para o mundo. Não existem muitos estudos que analisem as diferentes cepas do *M. tuberculosis* que ocorrem por todo o Brasil. É essencial que haja uma investigação epidemiológica para que se possam desenvolver programas de controle.

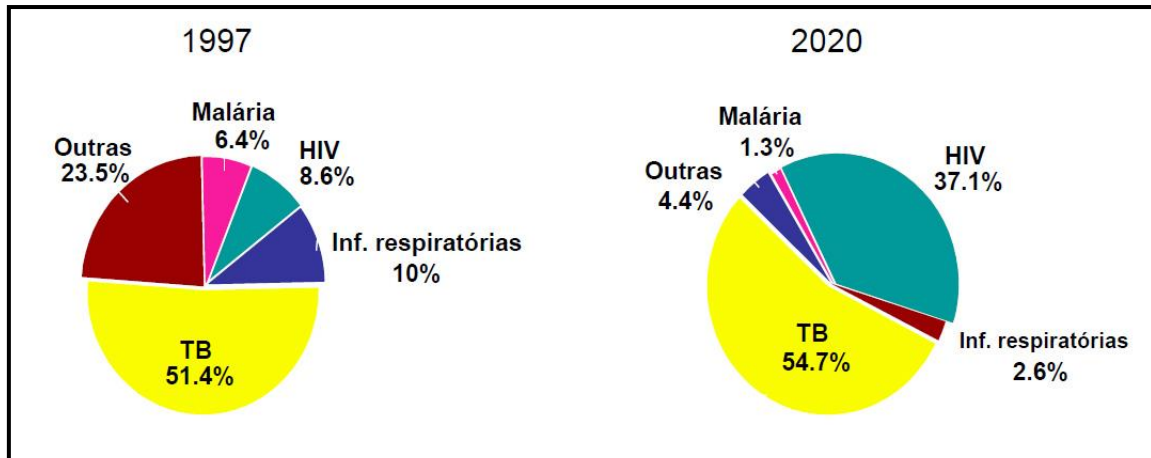
### 1.3 Epidemiologia da tuberculose

A tuberculose é uma das principais causas de morbidade e mortalidade afetando os principais grupos vulneráveis (adultos jovens, crianças e pessoas com HIV/aids). Como dito anteriormente as estimativas da OMS atualmente giram em torno de nove milhões de casos novos em todo o mundo, e quase um milhão e meio de óbitos por tuberculose para o ano de 2011. Efetivamente têm sido notificados para a OMS somente cerca da metade dos casos estimados. A maioria destes casos ocorreu nas regiões da Ásia (59%) e da África (26%), enquanto as regiões do Mediterrâneo Oriental (7,7%), Europa (4,3%) e Américas (3%) teriam os menores percentuais (OMS, 2012). A Figura 1 nos dá uma visão geral do número de mortes causadas por doenças infecciosas no mundo, onde notamos a grande expressão da

tuberculose tanto no ano de 1997 quanto na progressão estatística para o ano de 2020. Apesar do aumento no número de casos novos, a taxa de incidência global permaneceu relativamente estável de 1990 até por volta de 2001 e, em seguida, começou a cair. Entre os anos de 2010 e 2011 a taxa de declínio foi de 2,2%. A incidência da tuberculose vem diminuindo lentamente (menos de 1% ao ano), sendo estimada uma taxa de 125 casos por 100.000 habitantes (OMS, 2012).

Estimativas da OMS indicam que 20% das pessoas que adquirem tuberculose no mundo falecem (Ruffino-Netto, 2002; Costa Neto, 2007). Noventa e cinco por cento dos casos no mundo e 98% dos óbitos ocorrem em países emergentes (Ducati *et al.*, 2006). Embora os países da Ásia apresentem grandes populações e um grande número de casos de tuberculose em valores absolutos a maior incidência da doença se dá na África, principalmente nos países subsaarianos, onde os casos excedem 600 por 100.000 habitantes (Corbett *et al.*, 2006; Dye, 2006).

Figura 1 - Número estimado de mortes, em adultos, devido à doenças infecciosas, no mundo (1997 à 2020\*) \* Estimativa



Fonte: Banco Mundial, 1997.

Desde 1993 que o Brasil figura na lista dos 22 países do mundo considerados de alto índice da doença, que representam 82% da carga mundial da tuberculose. Entre os 8,7 milhões de casos, 0,5 milhões são crianças e 2,9 milhões de casos de tuberculose ocorrem em mulheres. Em 2007, o Brasil notificou 72194 casos novos, correspondendo a um coeficiente de incidência de 38/100.000 habitantes. Estes indicadores colocam o Brasil na 19ª posição em relação ao número de casos e na 104ª posição em relação ao coeficiente de incidência de acordo com a classificação

da OMS. A distribuição dos casos está concentrada em 315 dos 5564 municípios do país, correspondendo a 70% da totalidade dos casos. No Brasil, o estado de São Paulo apresenta o maior número absoluto de casos e o estado do Rio de Janeiro, a maior taxa de incidência da doença no País (71,8 casos por 100 mil habitantes). Mundialmente, em 2008, a tuberculose foi a 4ª causa de morte por doenças infecciosas e a 1ª causa de morte dos pacientes com aids (OMS, 2011). Portanto, estamos diante de uma doença muito importante no Brasil em termos de incidência e de amplo alcance social.

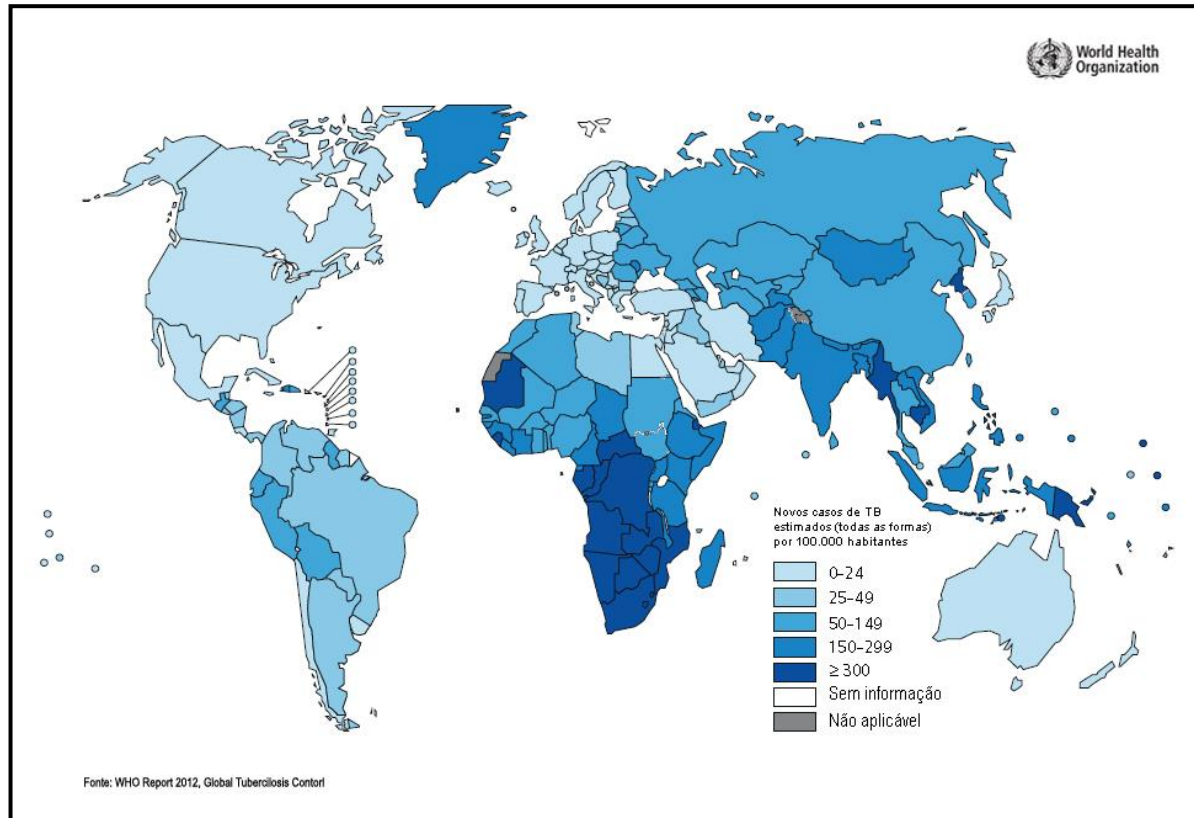
Aproximadamente 1/3 da população mundial já teve contato com o bacilo de Koch. O fato é que apenas 10% das pessoas que entram em contato com a bactéria desenvolvem sintomas de tuberculose. Esta resistência ocorre devido ao nosso sistema imune que é bastante competente em impedir a progressão da doença. Apesar desta resistência, a bactéria muitas vezes não é completamente eliminada pelo sistema imune, ficando adormecida no organismo, sem causar sintomas, à espera de uma queda imunológica para voltar a se multiplicar. A infecção inicia-se sempre pelos pulmões, mas pode se alastrar por todo o corpo. Nem todos desenvolvem a tuberculose ativa e alguns permanecem com a bactéria adormecida no organismo, tendo tido ou não sintomas de tuberculose pulmonar. A bactéria pode ficar alojada durante anos em qualquer parte do corpo, como cérebro, meninge, rins, intestinos, coração, linfonodos, ossos, entre outros (MD. Saúde, 2009).

A Figura 2 mostra a estimativa mundial da taxa de incidência da tuberculose em 2011. Como a incidência e letalidade da doença é primariamente influenciada pelas condições sócio-econômicas e pelo desinteresse dos políticos de saúde, a tuberculose apresenta alta prevalência em países subdesenvolvidos, que abrigam 95% de todos os casos (Ruffino Netto, 1997; Rosemberg, 1999; Lauzardo & Ashkin, 2000). Os cinco países de maior incidência da tuberculose em 2011 foram: Índia (2,0 milhões - 2,5 milhões), China (0,9 milhões - 1,1 milhões), África do Sul (0,4 milhões - 0,6 milhões), Indonésia (0,4 milhões - 0,5 milhões) e Paquistão (0,3 milhões - 0,5 milhões). A Índia e a China representam 26% e 12% dos casos globais, respectivamente.

A tuberculose segue as ondas de migração dos povos, desde os países em desenvolvimento até o alvo migratório, os países ricos, acelerando a sua expansão. Nestes países, imigrantes são responsáveis pelo aumento da incidência da doença

e pela introdução de cepas resistentes e do genótipo Beijing, principalmente na Europa e nos Estados Unidos (genótipo W) (Cain *et al.*, 2008; Pratt *et al.*, 2008).

Figura 2 - Estimativa da taxa de incidência da tuberculose, 2011

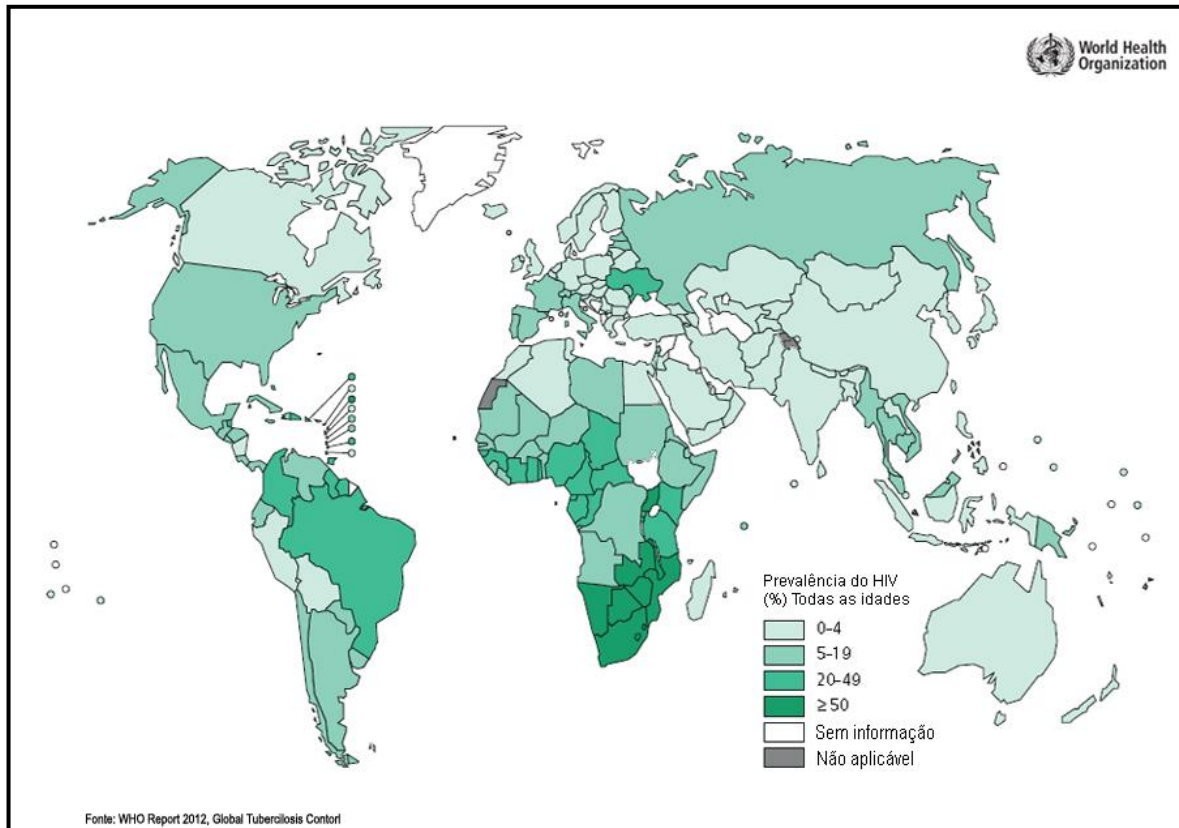


Com o surgimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), a epidemiologia da tuberculose foi modificada, o que dificultou mais ainda seu controle. A Figura 3 mostra a estimativa da prevalência do vírus da imunodeficiência humana (HIV) para novos casos de tuberculose no ano de 2011. Na África, notadamente na África do Sul, onde a incidência de tuberculose é de 560/100 mil habitantes, a prevalência de casos HIV positivos é de 18,8% da população.

A partir de 1986 a desorganização dos programas de controle da tuberculose trouxe consigo o aumento progressivo da incidência da doença no Brasil e no mundo (MS, 1998; Schluger & Rom, 1998; Kritski *et al.*, 2000; Espinal, 2001). Com o aumento do número de casos houve, em vários países e regiões, microepidemias de tuberculose MR, associadas ou não à aids, tanto em prisões como em ambientes hospitalares (Menzies *et al.*, 1995; Kritski *et al.*, 1997; Toledo *et al.*, 2000;

Shemyakin *et al.*, 2004). A infecção por HIV é o maior fator de risco para um indivíduo adoecer por tuberculose, sendo ele previamente infectado pelo bacilo. Ela é uma das primeiras complicações, surgindo antes de outras infecções frequentes, devido à maior virulência do *M. tuberculosis*.

Figura 3 - Prevalência estimada de HIV em novos casos de tuberculose, 2011



Nos países da África, da América Latina e em algumas populações de países desenvolvidos, 30 a 60% dos infectados com HIV estão co-infectados pelo bacilo da tuberculose. A proporção de indivíduos co-infectados foi maior para os países da África, que obteve uma estimativa de 39% dos casos de tuberculose, representando, em nível mundial, 79% dos casos de tuberculose entre pessoas com HIV (OMS, 2012).

Nos Estados Unidos, a proporção de pacientes HIV positivos com tuberculose gira em torno de 30 a 40%. Nesse mesmo país, onde a tuberculose vinha sendo reduzida, houve um pequeno aumento de casos no grupo de homens com idade sexualmente ativa, nos quais predomina a infecção por HIV. No Brasil, entre pessoas com 13 ou mais anos de idade, a tuberculose está presente em 27% do

total dos casos de AIDS notificados. A tuberculose, desde 1996, passou a ocupar o segundo lugar entre as doenças oportunistas ligadas à aids, ficando atrás somente da candidíase oral. Segundo a OMS, no Brasil entre 1980 e 2000, ocorreram 190.523 casos de aids. Estima-se que 20 a 40% destes indivíduos desenvolveram tuberculose que é a única doença contagiosa associada à infecção por HIV e pode ser também transmitida a indivíduos não infectados pelo vírus (SESMG, 2006).

Segundo a OMS, quando dados de pesquisa não estão disponíveis, a prevalência da tuberculose pode ser indiretamente estimada através do produto da incidência e a duração média da doença, mas com uma considerável incerteza. Houve uma prevalência da tuberculose em 2011 de 12 milhões de casos, equivalente a 170 casos por 100.000 habitantes. A taxa de prevalência caiu mundialmente em 36% desde 1990. A taxa de mortalidade (excluindo mortes entre HIV positivos) tem caído 41% desde 1990 graças às pesquisas realizadas na área (OMS).

A tuberculose MR é uma doença crônica que envolve diagnóstico e tratamento complexos. Mundialmente, em 2011, foram estimados 630.000 casos de tuberculose MR (variando de 460.000 a 790.000) entre os 12 milhões de casos da doença.

#### **1.4 Tratamento da tuberculose**

O tratamento para tuberculose consiste na administração padronizada de drogas combinadas. Para casos novos é utilizado por 2 meses uma combinação de INH, RMP, PZA e EMB (fase intensiva) e, em seguida INH e RMP por 4 meses (fase de continuação), totalizando 6 meses de tratamento. No entanto, se o paciente possuir histórico de tratamento prévio, a administração das drogas é feita da seguinte maneira: 2 meses de INH, RMP, PZA, EMB e ST (estreptomicina) (fase intensiva), um mês de INH, RMP, PZA e EMB (ainda denominada fase intensiva) e cinco meses de INH, RMP e EMB (fase de continuação), totalizando 8 meses de tratamento. Já no caso da MR, a duração mínima para o tratamento sobe para 18 meses e seu custo torna-se muito mais elevado. Este tratamento, além de drogas de primeira linha e fluoroquinolonas administradas via oral, inclui drogas injetáveis

como canamicina, amicacina, capreomicina ou estreptomicina. A fase intensiva, que inclui as drogas injetáveis, deve ocorrer por pelo menos 6 meses e a duração total do tratamento não deve ser inferior à 18 meses (Muller *et al*, 2013).

Uma vez que cada droga tem seus alvos específicos, a retirada de uma droga do tratamento pode causar resistência selecionando organismos que não são afetados pelos outros medicamentos. A resistência às drogas também pode surgir espontaneamente nos bacilos, mas a principal causa de existirem bacilos resistentes é a não adesão ao tratamento. A partir de 1982, com a adoção do esquema de tratamento medicamentoso de seis meses mencionado acima (exceto EMB que foi incluído recentemente no esquema de tratamento inicial), denominado esquema “de curta duração” (Diniz *et al.*, 1995; Picon *et al.*, 2000), passou-se a acreditar na extinção gradual da tuberculose.

Em 1993, a OMS passou a recomendar a estratégia DOTS (tratamento diretamente observado de curta duração), no qual o governo de cada nação tem que se comprometer em tratar os casos de tuberculose e evitar a disseminação da doença (Frieden, 2007). A estratégia tem como objetivos diminuir acentuadamente o abandono do tratamento, a mortalidade por tuberculose, o surgimento da MR, além de aumentar para acima de 70% os casos diagnosticados e 85% os casos de cura. Nesta estratégia, a OMS recomenda cinco itens operacionais: 1. O compromisso político de cada país em alocar verbas para o controle da tuberculose; 2. Melhoria dos laboratórios com o objetivo de aumentar o diagnóstico bacteriológico da doença; 3. Garantir o suprimento constante de medicamentos de alta qualidade; 4. Manter um sistema de registro e controle dos casos; 5. Proceder o DOTS (Davies, 2003; Cavalcante *et al.*, 2007). Esta estratégia também deve ser aplicada nos casos de MR (DOT-Plus) (Zumia *et al.*, 2001). Nesta década, grandes regiões críticas no mundo vêm aplicando com sucesso esta estratégia (Figura 4) (Subramani *et al.*, 2008).

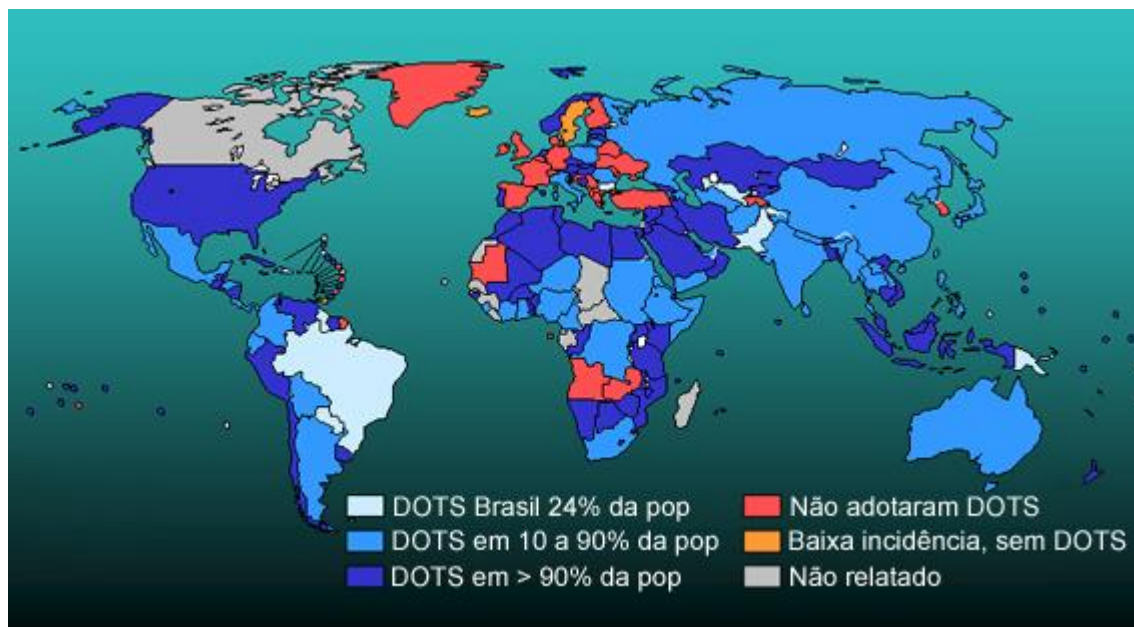
Em 2011, 6,2 milhões de casos de tuberculose foram notificados por programas nacionais de controle da doença e reportados à OMS: 5,8 milhões foram indivíduos com casos novos e 0,4 milhões previamente tratados (cujo regime de tratamento foi alterado). A Índia e a China foram responsáveis por 39% dos casos de tuberculose notificados para todo o mundo em 2011. A África ficou em segundo lugar com 24% e os 22 países com maior incidência da doença foram responsáveis por 81% dos casos (OMS, 2012).



A estratégia DOTS resultou em grandes conquistas para o cuidado e controle da tuberculose. Entre 1995 e 2011, 51 milhões de pessoas foram tratadas com sucesso para tuberculose nos países que adotaram a estratégia, salvando 20 milhões de vidas (OMS, 2012).

Em nosso país, um inquérito epidemiológico de resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose, realizado no período de 1995 a 1997, que incluiu 5.138 pacientes com tuberculose pulmonar e baciloscopia positiva, de 13 unidades da Federação, mostrou taxa de resistência primária ao tratamento com INH e RMP de 1,1%, exibindo, ainda, MR adquirida de 7,94% (Braga *et al.*, 2003). Neste inquérito não houve distinção de casos HIV positivos que, quando em tratamento hospitalar, adquirem tuberculose com taxa de resistência primária significativamente maior (Gomes *et al.*, 2000). Mas o HIV não é um fator de risco independente para a MR (Espinal *et al.*, 2001b). Em países com resistência primária significativa, o tratamento inicial da tuberculose com quatro drogas (RMP, INH, PZA e EMB) já vem sendo realizado há algum tempo (Gillespie, 2002; Timperi *et al.*, 2005).

Figura 4 - DOTS no mundo e no Brasil Ano 2004



Fonte: <http://www.saude.gov.br>

O *M. tuberculosis* apresenta uma frequência de mutantes naturalmente resistentes à drogas, variável de acordo com cada uma delas (Gutmacher *et al.*, 2002). São extremamente raros para RMP (1 em cada 10 milhões), menos raros para o etambutol (EMB), a INH e a estreptomicina (ST) (1 em cada 100 ou 10 mil) e

mais frequentes para a etionamida e a pirazinamida (1 em cada mil) (Gillespie, 2002). Esta é a chamada resistência natural aos medicamentos que se deve a mutações genéticas existentes previamente nas populações bacilares, antes mesmo da exposição a eles. Por esta razão, para evitar a seleção de bacilos resistentes, o tratamento inicial é realizado com pelo menos quatro drogas, com ações diferentes entre si. No entanto, o principal mecanismo de resistência do *M. tuberculosis* aos fármacos se dá por mutação genética adquirida que é a chamada resistência adquirida. Como mencionado anteriormente, esta é desencadeada por tratamentos irregulares, interrompidos antes de uma completa esterilização do organismo ou com doses inadequadas. Neste caso, uma mesma cepa bacilar pode desenvolver resistência a um ou mais medicamentos (Espinal *et al.*, 2001a).

Bacilos multirresistentes são, quase sempre, produtos de tratamentos inadequados. Os bacilos resistentes selecionados, além de exigirem medicamentos diferentes dos anteriormente utilizados, podem ser transmitidos para outros indivíduos que, mesmo sem qualquer tratamento prévio, já apresentarão cepas resistentes. Esta é a chamada resistência primária. Quanto mais medicamentos forem utilizados de forma inadequada, mais resistência irá aparecer, selecionando cepas resistentes a mais de uma droga, como na MR. No Brasil, um bacilo é considerado MR quando há resistência à 3 das principais drogas utilizadas nos esquemas de tratamento (RMP, INH e mais uma - EMB, ST ou PZA). A MR sempre causa impacto social, operacional, financeiro e epidemiológico (Rajbhandary *et al.*, 2004).

No Brasil, o tratamento inicial com duração de seis meses tem custo para o Ministério da saúde (MS) de menos de cem reais. Entretanto, o tratamento para a MR, com duração mínima de 18 meses, possui custo superior a quatro mil dólares (Fortes & Dalcolmo, 1997; Dalcolmo *et al.*, 1999).

## 1.5 Multirresistência

Como foi dito anteriormente, a interrupção da quimioterapia ocasiona comumente a chamada MR à drogas. A transmissão destes bacilos é uma séria questão de saúde pública, aumentando os óbitos, o número de casos e o custo do

tratamento. O *M. tuberculosis* tem a mutação genética como principal mecanismo de resistência para os medicamentos (Telenti, 1998). Genes específicos relacionam-se a antibióticos específicos na aquisição de resistência e não há resistência cruzada ou "em bloco". Ela se faz droga por droga. O Quadro 1 mostra a relação entre medicamentos para a tuberculose e os genes associados (Muller *et al.*, 2013).

Quadro 1 - Drogas antituberculosáticas e mecanismos de resistência às drogas

| Droga                       | Gene envolvido na resistência | Função  | Papel na formação da resistência quando mutado |
|-----------------------------|-------------------------------|---|--|
| Isoniazida                  | <i>ahpC</i>                   | Alquil hiperperoxida redutase                     | Mutações Compensatórias                        |
|                             | <i>fabG</i>                   | 3-Oxoacil-tioester redutases                      | Desconhecido                                   |
|                             | <i>fadE24</i>                 | Envolvido na $\beta$ -oxidação de ácidos graxos   | Desconhecido                                   |
|                             | <i>inhA</i>                   | Enoil redutase                                    | Alteração do alvo da droga                     |
|                             | <i>inhA</i> promotor          | Regulação da expressão do <i>inhA</i>             | Superexpressão do alvo da droga                |
|                             | <i>iniA</i>                   | Associação com bomba de efluxo                    | Atividade alterada da bomba de efluxo          |
|                             | <i>katG</i>                   | Catalase/peroxidase                               | Eliminação da conversão da pré-droga           |
| Rifampicina                 | <i>rpoA</i>                   | $\alpha$ -Subunidade da RNA polimerase            | Mutações compensatórias                        |
|                             | <i>rpoB</i>                   | $\beta$ -Subunidade da RNA polimerase             | Alteração do alvo da droga                     |
|                             | <i>rpoC</i>                   | $\beta'$ -Subunidade da RNA polimerase            | Mutações compensatórias                        |
| Pirazinamida                | <i>pncA</i>                   | Nicotinamidase                                    | Eliminação da conversão da pré-droga           |
| Estreptomicina              | <i>gidB</i>                   | 7-metilguanosina metiltransferase                 | Alteração do alvo da droga                     |
|                             | <i>rpsL</i>                   | S12 proteína ribossomal                           | Alteração do alvo da droga                     |
|                             | <i>ssr</i>                    | 16S rRNA  | Alteração do alvo da droga                     |
| Etambutol                   | <i>embA</i>                   | Arabinosil transferase                            | Alteração do alvo da droga                     |
|                             | <i>embB</i>                   | Arabinosil transferase                            | Alteração do alvo da droga                     |
|                             | <i>embC</i>                   | Arabinosil transferase                            | Alteração do alvo da droga                     |
|                             | <i>embR</i>                   | Regulador da expressão de <i>embCAB</i> do operon | Superexpressão do alvo da droga                |
|                             | <i>iniA</i>                   | Associação com bomba de efluxo                    | Atividade alterada da bomba de efluxo          |
|                             | <i>rmlD</i>                   | dTDP-4-dehidroramnose redutase                    | Desconhecido                                   |
| Fluoroquinolonas            | <i>gyrA</i>                   | DNA girase  | Alteração do alvo da droga                     |
|                             | <i>gyrB</i>                   | DNA girase  | Alteração do alvo da droga                     |
| Canamicina/amicacina        | <i>rrs</i>                    | 16S rRNA  | Alteração do alvo da droga                     |
|                             | <i>rrs</i>                    | 16S rRNA  | Mutações Compensatórias                        |
| Capreomicina/viomicina      | <i>tlyA</i>                   | rRNA metiltransferase                             | Alteração do alvo da droga                     |
|                             | <i>rrs</i>                    | 16S rRNA  | Alteração do alvo da droga                     |
| Etionamida                  | <i>inhA</i>                   | Enoil redutase                                    | Alteração do alvo da droga                     |
|                             | <i>inhA</i> promotor          | Regulação da expressão de <i>inhA</i>             | Superexpressão do alvo da droga                |
| Ácido para-amino-salicílico | <i>thyA</i>                   | Timidilate sintase A                              | Eliminação da conversão da pré-droga           |

Fonte : Adaptado de Muller *et al.*, 2013

Os mecanismos bioquímicos e genéticos associados à MR em *M. tuberculosis* comumente envolvem mutações nos genes que codificam proteínas que são alvo direto das drogas ou que as metabolizam. As mutações podem envolver trocas de aminoácidos que vão gerar uma proteína com menos atividade ou afinidade pela droga ou nos promotores dos genes, alterando a expressão gênica. Cada droga

apresenta pelo menos uma proteína envolvida em seu metabolismo e ação que pode ser alvo de alterações genéticas.

O *M. tuberculosis* também possui outras formas de resistência aos medicamentos. Como em todas as bactérias existem mecanismos de barreira, como bomba de efluxo e parede celular protetora, que no gênero *Mycobacterium* é espessa, constituída essencialmente de ácidos micólicos. Esta característica reduz a permeabilidade a inúmeras substâncias, inclusive dando-lhe resistência a ácidos e álcalis fortes, propriedade que permite, no laboratório, o uso destas substâncias para descontaminação de outras bactérias. O *M. tuberculosis* também produz  $\beta$ -lactamases e outras enzimas modificadoras de medicamentos que lhes dão proteção contra inúmeros antibióticos.

Em nosso país, um inquérito epidemiológico em nível nacional, realizado pelo MS nos anos de 1996-1997, revelou uma incidência de resistência à INH tanto nos casos virgens de tratamento (resistência primária) quanto nos casos de retratamento (resistência adquirida), de 4,4 e 11,3%. Estes valores foram mais baixos para a RMP com resistência primária de 1,3%, e adquirida de 6,6%. A resistência total para os outros medicamentos foi baixa (0,3% para a estreptomicina, 0,1 % para o EMB e praticamente zero para a PZA). A resistência primária combinada para INH e RMP foi de 1,1% (Braga *et al.*, 2003). Por isso o tratamento inicial para a tuberculose no Brasil é feito com a associação de três medicamentos (CRFHF, 2002). Por outro lado, em outros países, nos quais a resistência primária é alta, faz-se necessária a associação de mais um medicamento, como EMB ou ST (Timperi *et al.*, 2005).

Atualmente, em muitos países a prevalência de MR permanece em menos de 1%. Todavia, em determinadas regiões a proporção de MR é alarmante. Na província de Henan, na China, a proporção de MR é de 35% dos casos. Em Oblast, na Rússia, 43,4% das cepas do genótipo Beijing são MR, ao contrário das outras cepas em que a proporção de MR é de 10%. Na Latvia, Rússia, a MR primária é de 8,6% e a resistência total é de 34,5%. Na Lituânia, ocorre um dos maiores índices de MR do mundo, com 9% de resistência primária e 54% adquirida (Huang *et al.*, 2002; Tounghousova *et al.*, 2002; Tracevska *et al.* 2003, Dewan *et al.* 2002). A disseminação de cepas MR e do genótipo Beijing, de maior virulência (Bifani *et al.* 2002; Kremer *et al.*, 2004; Kubica *et al.*, 2004; Sajduda *et al.*, 2004), representam uma séria ameaça para o mundo (Espinal *et al.*, 2003).

No ano 2000, após padronização de um esquema de tratamento para a MR pelo MS, o Centro de Referência Prof. Helio Fraga (CRPHF) criou o Programa de Vigilância Epidemiológica da tuberculose MR, com a notificação e acompanhamento dos casos e a organização de um banco de dados nacional. Atualmente, o Sistema de Informação da tuberculose MR (Sistema TbMR), ligado ao CRPHF, gerencia o banco de dados, o provedor do sistema informatizado, os medicamentos específicos e é referência técnica para as unidades de tratamento.

Inicialmente, o tratamento padronizado pelo MS, para MR, compreendia o uso de cinco medicamentos: clofazimina, EMB (ou PZA), amicacina, terizidona e ofloxacina. A partir de 2005, a clofazimina foi retirada do esquema, por recomendação da OMS (que a destinou exclusivamente para o tratamento da hanseníase), e foi substituída pela PZA durante os primeiros seis meses. Este tratamento, administrado por 18 a 24 meses, é sabidamente menos efetivo do que os regimes de primeira linha e apresenta mais efeitos colaterais, além de oferecer custo muito mais elevado.

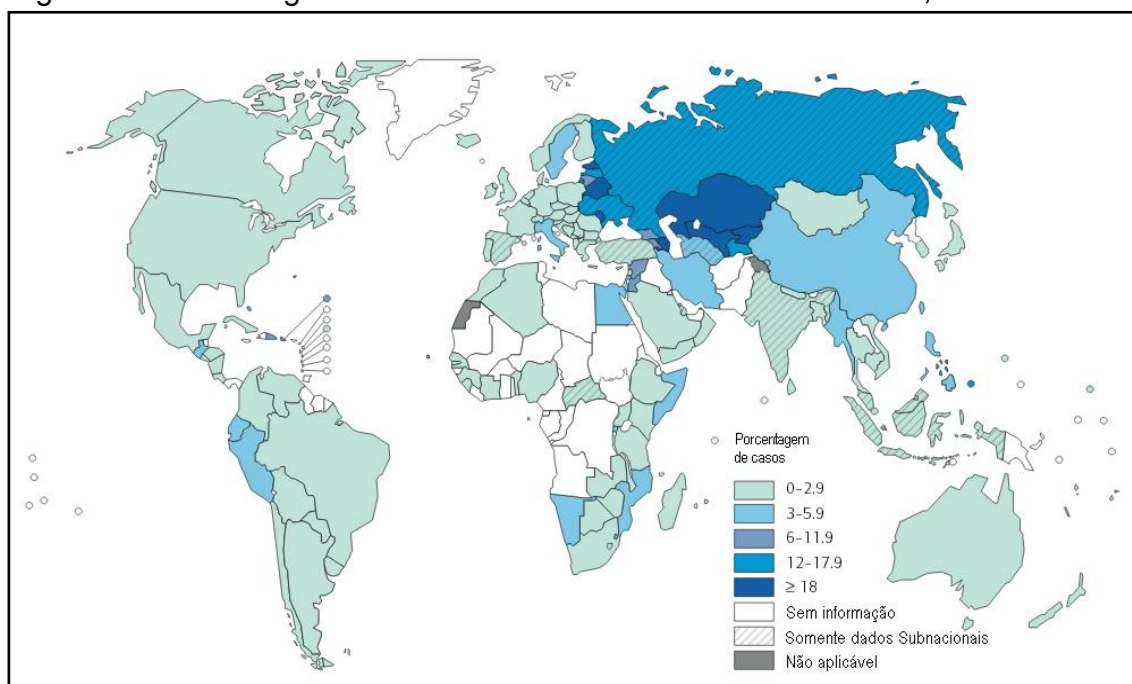
O banco de dados do Sistema TbMR demonstra que de 2000 a 2006 foram notificados 2308 novos casos de tuberculose MR no Brasil. Destes, 65,3% dos casos foram do sexo masculino. A média de idade compreendeu a faixa de 35 a 44 anos. Em 94,3% dos casos a resistência foi adquirida. A resistência primária foi de 5,7%. Dos pacientes tratados no período de 2000 a 2004, 62% se curaram, 8% abandonaram o tratamento, 11% faleceram e 18% evoluíram com falência e doença crônica. Houve 7% de associação com a infecção pelo HIV, inferindo-se não existir relação direta entre MR e infecção por HIV, como acontece nos países africanos. No entanto, os doentes com esta associação evoluíram com menor taxa de cura e maior número de óbitos que os demais. No período de 2000 a 2006, 34% dos casos de MR ocorreram no estado do Rio de Janeiro (OMS, 2008a).

A MR vem aumentando gradativamente no mundo, na ausência de novos e eficientes medicamentos que possam controlá-la (Espinal *et al.*, 2001; Petrini *et al.*, 1999). Conforme dados da OMS, no ano de 2000 houve 273 mil casos de tuberculose MR no mundo (3,1% do total de casos). Em 2006, o número de casos foi de 489 mil (4,8% de todos os casos de Tuberculose) e em 2011 este valor aumentou para 630 mil. Um percentual de 3,7% de novos casos e 20% de casos previamente tratados são MR (OMS, 2012). A Figura 5 mostra mundialmente a porcentagem de MR entre os novos casos de tuberculose para o ano de 2011. As incidências variam

de 0% a 32,3% e são mais altas em Belarus (32,3%), Estônia (22,9%), Cazaquistão (30,3%), Kyrgyzstão (26,4%), República da Moldávia (19,4%) e Uzbequistão (23,2%). Embora a média da proporção de pacientes com MR na Federação Russa seja menor que em outros países, a proporção é alta em Oblast (35,1% em 2010) (OMS, 2012).

Os países com maior número de casos foram: China, Índia, Tailândia e países da antiga União Soviética, principalmente a Estônia. China e Índia responderam por, aproximadamente, 50% dos casos do mundo, e a Federação Russa por 7% dos casos. A República Dominicana, Argentina e Peru apresentam números significativos de MR. Os países da Europa Ocidental e os Estados Unidos mostraram baixa incidência de MR (OMS, 2008b). O maior número de casos de tuberculose nestes países vem ocorrendo em imigrantes (Loddenkemper *et al*, 2002).

Figura 5 - Porcentagem de novos casos de tuberculose com MR, 2011

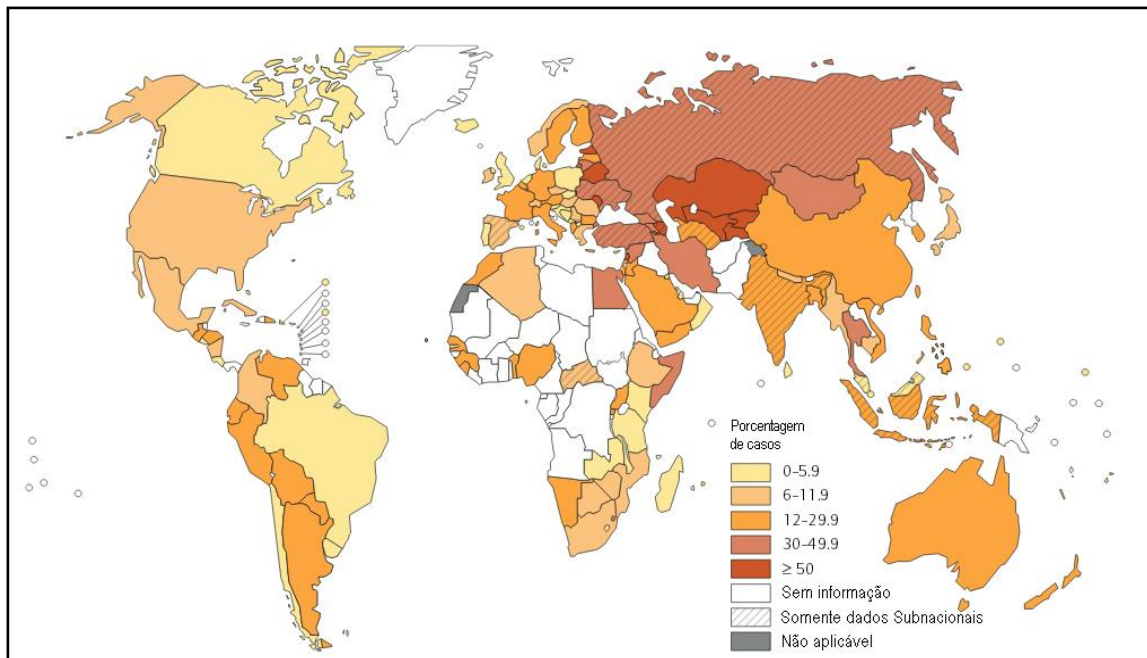


Fonte: OMS, 2012.

A proporção de casos MR Tuberculose previamente tratados é mostrada na Figura 6. Esta proporção varia de 0% a 65,1%. Países com áreas subnacionais que obtiveram os índices mais altos foram: Azerbaijão (cidade de Baku, 55,8% em 2007), Belarus (75,6% em 2011), Estônia (57,7% em 2011), Casaquistão (51,6% em 2011), República da Moldávia (63,5% em 2011), Tajiquistão (53,6% em 2011) e Uzbequistão (62,0% em 2011). Estes dados confirmam que os países da Europa

oriental e da Ásia Central continuam a representar áreas críticas para MR, com quase um terço dos novos casos e dois terços dos casos previamente tratados para tuberculose sendo representados por estas regiões.

Figura 6 - Porcentagem de casos de tuberculose com MR previamente tratados, 2011



Fonte: OMS, 2012.

Atualmente, uma grande ameaça para o mundo é a possível expansão de um tipo de tuberculose denominado tuberculose-XDR (*extremely drug-resistant tuberculosis*), inicialmente descrito na província de KwaZulu-Natal, cidade de Tugela Ferry, na África do Sul (OMS, 2007). A tuberculose-XDR caracteriza-se pela resistência à INH, RMP, à pelo menos mais uma medicação de segunda linha injetável – canamicina, amicacina ou capreomicina - e a qualquer fluoroquinolona (Raviglione, 2008). Seu diagnóstico é dificultado pela necessidade de comprovação bacteriológica, por cultura e testes de sensibilidade para medicações de segunda linha, que ainda não estão padronizados. O tratamento deste tipo de tuberculose é extremamente difícil, tanto pela escassez quanto pelo preço dos fármacos envolvidos. Já foram encontradas cepas XDR em mais de 50 países, inclusive no Brasil, apesar de em nosso país os estudos sobre elas ainda serem escassos (Chan e Iseman, 2008; Dye, 2009).

Em Maio de 2006 foi divulgada uma epidemia de tuberculose-XDR em Tugela Ferry, uma cidade rural da província de KwaZulu-Natal na África do Sul. Foram identificados 53 casos de tuberculose-XDR desde Janeiro de 2005 a Março de 2006. Metade destes doentes não possuíam tratamento anterior para tuberculose e seis eram trabalhadores de saúde. Destes 53 doentes, 44 fizeram o teste de HIV e todos foram positivos. A média de sobrevivência foi de 16 dias após a colecta de expectoração, período que resultou em 52 óbitos. Até Setembro de 2007 foram identificados cerca de 400 casos de tuberculose-XDR em 39 hospitais da África do Sul (OMS, 2006b).

Os números mais significativos de tuberculose-XDR ocorrem nos países da antiga União Soviética, onde aproximadamente 10% de todos os casos de MR são XDR, variando de 4% na Armênia até a quase 24% na Estônia. Na África do Sul, a proporção de casos XDR entre os casos MR foi de 5,6%. Porém, na província de KwaZulu-Natal a proporção foi de 14%, conforme os dados coletados de 2004 a 2007 (Singh *et al.*, 2007). Os casos de tuberculose-XDR têm sido poucos na Europa central e ocidental, bem como na América (CDC, 2006). A tuberculose-XDR, assim como a MR, ocorre pela não aderência dos doentes ao tratamento ou quando estes se infectam com bacilos já resistentes (resistência primária) (Teixeira, 2007). Os países africanos estarão entre as nações com maior incidência da MR e de HIV positivos no mundo, se considerarmos o número de novos casos em termos de população (Zager e McNerney, 2008).

A tuberculose-XDR surgiu como uma grande ameaça para o mundo (Raviglione, 2008). O tratamento deste tipo de tuberculose é extremamente difícil, pela escassez e preço dos fármacos envolvidos. Na Coreia, um grupo de 1.407 pacientes, com diagnóstico de MR, HIV-negativos, foram analisados como uma coorte por sete anos. Setenta e cinco casos apresentavam Tuberculose – XDR (5,3%). O número de curas foi baixo no grupo XDR (29,3% vs. 46,2%,  $p = 0,004$ ) e a mortalidade maior (49,3% vs. 19,4%,  $p < 0,001$ ) (Kim *et al.*, 2008). Em outro trabalho, nos Estados Unidos, envolvendo 651 casos de MR, 48 (7,4%) eram XDR e HIV negativos. O tempo de tratamento teve mediana de 25 meses e o regime de tratamento compreendia uma média de 5,3 medicamentos. Os fármacos mais usados foram: capreomicina, moxifloxacina ou levofloxacina, cicloserina, etionamida, amoxicilina + clavulanato e clofazimina (medicamento já fora de uso). Outros fármacos, como etambutol, pirazinamida, amicacina e ácido paramino salicílico

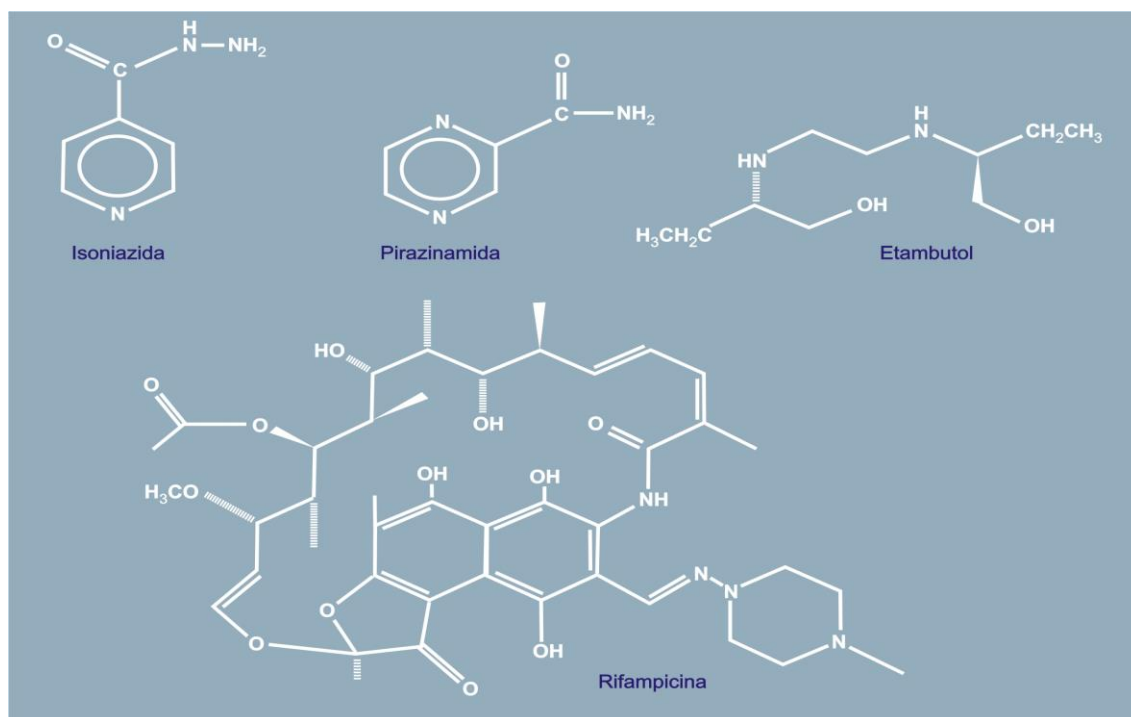


(PAS), também foram empregados em menor número. Os autores tiveram cura em 29 casos (60,4%), abandonos em 3 (6,2%) e óbitos em 11 (22,9%). Cinco casos (10,9%) se tornaram falidos. A percentagem de cura deste trabalho foi alta, considerando-se a gravidade da doença (Mitnick *et al.*, 2008). É clara a necessidade do desenvolvimento de medidas para controle da disseminação das cepas MR e XDR, assim como testes rápidos para sua detecção, possibilitando uma intervenção terapêutica mais eficiente.

## 1.6 Resistência à Isoniazida

A INH e a RMP são os medicamentos mais eficazes para o tratamento da tuberculose. A INH tem estrutura simples, constituída de um anel piridínico e um grupo hidrazida (Figura 7). É altamente ativa contra o *M. tuberculosis*, com concentração inibitória mínima variando de 0,02 a 0,2 µg/mL. Sua ação se restringe ao bacilo em crescimento não agindo contra a forma latente (Zhang *et al.*, 2005).

Figura 7 - Estrutura química da isoniazida, da rifampicina, da pirazinamida e do etambutol

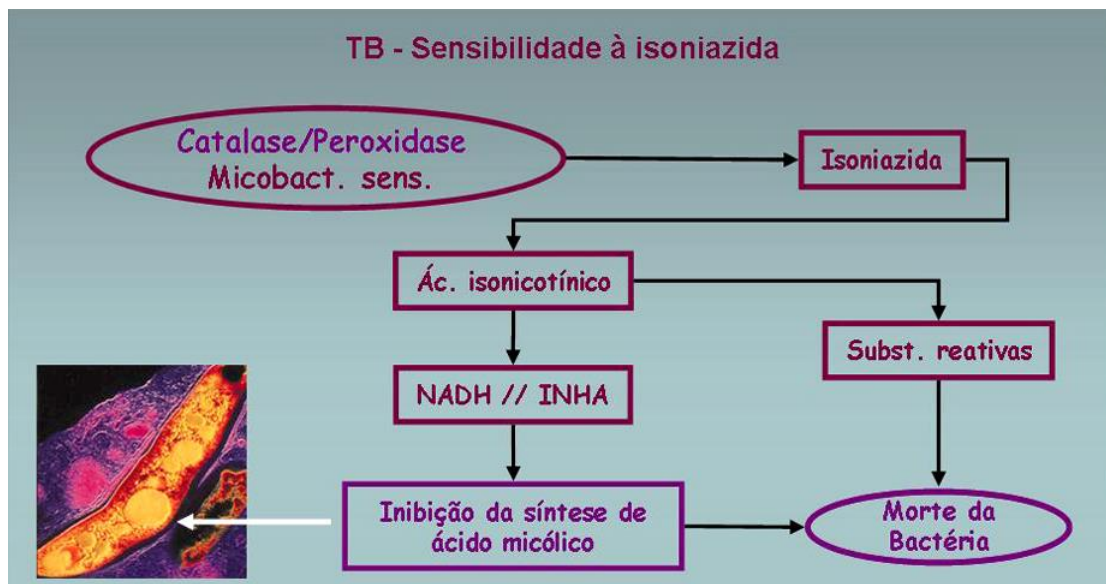


Fonte: Adaptada de Zhang *et al.*, 2005.

Ao contrário da resistência à RMP, na qual a maioria das mutações se concentra em uma pequena região de um só gene, a resistência à INH é mais complexa, pois pode ocorrer por mutações em vários genes, sendo os mais importantes o *katG* (32 a 93% dos casos), e o *inhA* (de 15 a 25%) (Höfling *et al.*, 2005).

O gene *katG* codifica a enzima catalase-peroxidase, importante para o metabolismo do bacilo (Rouse *et al.*, 1996). Esta enzima ativa a INH, que é uma pré-droga (Figura 8 A e B), produzindo radicais reativos de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrato) e radicais orgânicos que inibem a formação de ácidos micólicos da parede bacilar e produzem dano no DNA (Ramaswami & Musser, 1998; Slayden & Barry, 2000). A mutação mais comum no gene *katG* surge no códon 315 pela substituição do aminoácido serina (AGC) por treonina (ACC), com diminuição da atividade catalase, o que resulta em resistência à INH (Slayden & Barry, 2000; Pyn *et al.*, 2002).

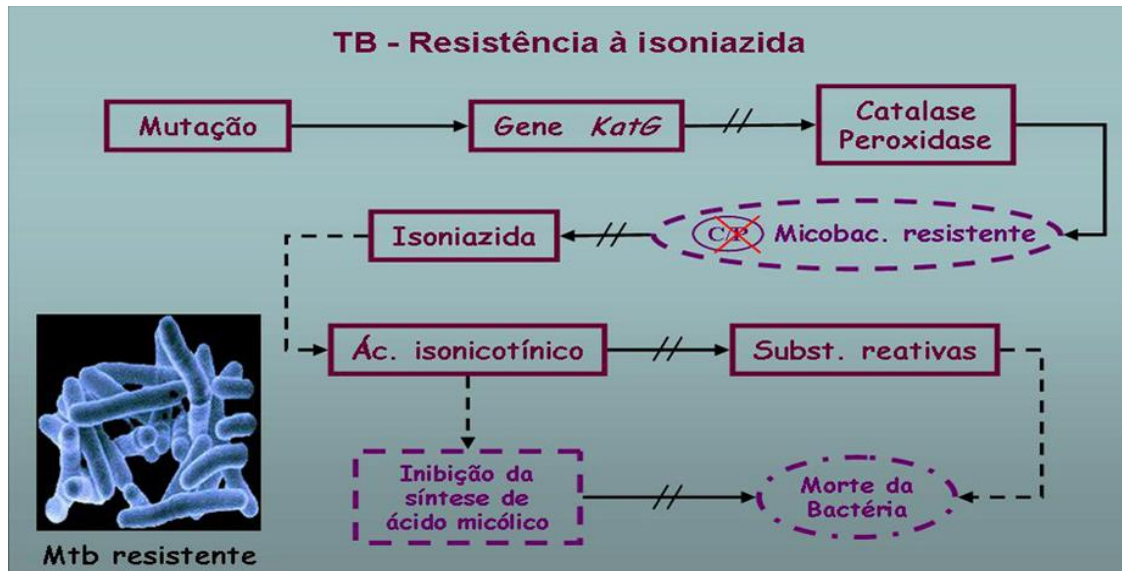
Figura 8 - Sensibilidade à isoniazida



A isoniazida é uma pré-droga que sob a ação da catalase - peroxidase bacteriana se transforma em substâncias reativas tóxicas e se liga à NADH bloqueando a ação da enzima acil (ACP) redutase (INHA), importante na síntese de ácidos micólicos, produzindo morte celular. Mutações no gene *katG* produzem

diminuição acentuada da enzima catalase – peroxidase e a não ativação da isoniazida, o que caracteriza a resistência.

Figura 9 -Resistência à Isoniazida



O gene *inhA* codifica a enzima carreadora de enoil – acil (ACP) redutase - NADH dependente, importante na síntese de ácidos micólicos. Um dos produtos da INH ativada – o radical acil isonicotínico – se liga à NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e impede a atividade da enzima, resultando na morte da bactéria, por interferência na síntese dos ácidos micólicos (Slayden *et al.*, 2000). A mutação estrutural do gene *inhA* faz com que a enzima modificada perca afinidade pelo NADH e com isso a bactéria se torna resistente à INH (Basso *et al.*, 1998). O gene *mabA* que codifica a enzima 3-cetoacil ACP redutase também participa na síntese dos ácidos micólicos e forma um *operon* *mabA-inhA*. Mutações na região promotora do gene *inhA* (que precede o *operon*) produzem superexpressão do gene e resistência à INH por mecanismo de aumento do consumo dos derivados da Isoniazida. Este tipo de mutação é mais freqüente que a mutação na estrutura do gene (Heym *et al.*, 1999; Cardoso *et al.*, 2004).

Mutações no gene *kasA* (codifica a enzima beta – cetoacil ACP sintase, que participa da síntese do ácido micólico) são mais raras e na maioria das vezes associadas a mutações nos genes *katG* ou *inhA*. Mutações na região intergênica *oxyR – ahpC*, onde se localiza o promotor do gene *ahpC*, são consideradas como

um mecanismo regulador do estresse oxidativo para compensar a perda de função da enzima catalase – peroxidase nas cepas INH resistentes (Cardoso *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2003).

### 1.7 Resistência à Rifampicina

A RMP é o fármaco mais potente dos medicamentos para tuberculose. É um antibiótico de largo espectro, com estrutura química complexa (Figura 6) e lipofílica. Esta propriedade permite uma rápida difusão do fármaco através da parede hidrofóbica do *M. tuberculosis*. Sua ação bactericida se faz tanto no bacilo em crescimento quanto na fase estacionária. Esta característica lhe permite atuação eficiente no encurtamento da terapêutica para tuberculose (Zhang & Telenti, 2000). A concentração inibitória mínima, capaz de matar 99% das bactérias sensíveis, é de 40µg/mL.

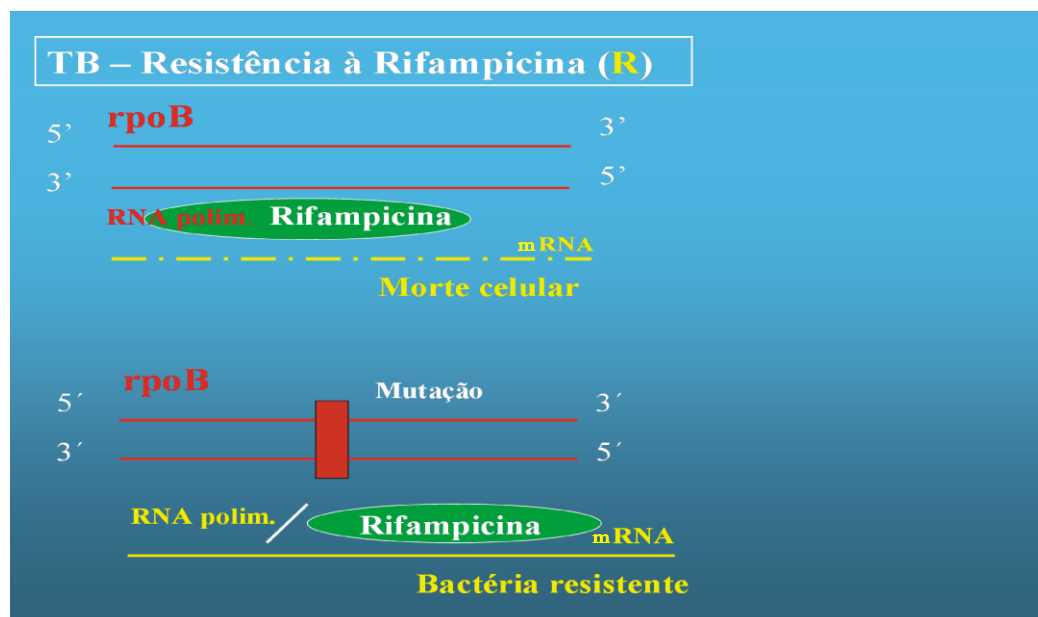
A resistência à RMP é causa importante de falência no tratamento da tuberculose. Além de exercer um potente efeito bactericida inicial sobre os bacilos metabolicamente ativos, esta droga possui excelente efeito esterilizante tardio, agindo sobre bacilos semidormentes. Foi este efeito, aliado à eficácia adicional da INH e da PZA, que possibilitou a redução do tratamento de um ano para seis meses. Portanto, a rifampicina é desde seu surgimento há mais de 30 anos é o medicamento mais importante no tratamento da tuberculose.

A RMP inibe a transcrição gênica da micobactéria por bloqueio da RNA-polimerase DNA dependente, impedindo a síntese de RNA mensageiro (mRNA), produzindo morte celular (Figura 9) (Ramaswami & Musser, 1998). Mutações do DNA produzem modificações da estrutura da RNA polimerase fazendo com que a RMP não mais se ligue à esta enzima, liberando a síntese de mRNA. Cerca de 95% das cepas resistentes à rifampicina apresentam mutações na região central do gene *rpoB* que codifica a subunidade beta da RNA polimerase (Telenti *et al.*, 1993; Miller *et al.* 1994; Somoskovi *et al.*, 2001; Gillespie, 2002). Esta região central, denominada *rifampicin resistance determining region* (RRDR) ou *hot spot*, possui 81 pb (27 códons) e é delimitada pelos códons 507 a 533. Mais de 96% das cepas resistentes à RMP apresentam mutações nesta região, o que facilita o diagnóstico

molecular de resistência (Whelen, 1995; Oliveira *et al.*, 2003; Somoskovi *et al.*, 2001; Gillespie, 2002). As mutações mais freqüentes nesta área ocorrem nos códons 526 e 531 (Mani *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 1994).

As mutações mais freqüentes (65 – 86%) alteram o códon 526 ou 531 e resultam em alta resistência a RMP. Entretanto, nem todas as mutações na região de 81 pb conferem o mesmo grau de resistência. Mutações nos códons 511, 516, 518 e 522 conferem uma baixa resistência a esta droga (Somoskovi *et al.*, 2001). Estudos adicionais sobre mutações no genoma do *M. tuberculosis* são importantes para melhor compreensão dos mecanismos de resistência, suas variações regionais e correlações com a doença.

Figura 10 - Resistência à Rifampicina. Mutações no gene *rpoB* produzem modificação na região de ligação da RNA polimerase com a rifampicina e perda de sua ação



Legenda: Em vermelho a dupla fita de DNA do gene *rpoB*. A RMP liga-se a RNA polimerase e inibe a formação de mRNA (em amarelo).

Fonte: Siqueira *et al.*, 2005.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Analisar um banco de DNA, constituído de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes do Centro de Referência Prof. Helio Fraga (FIOCRUZ), realizando a genotipagem através de IS6110-RFLP, Spoligotyping e análise mutacional de *katG* e *rpoB* para permitir uma melhor compreensão da epidemiologia da tuberculose em nosso país.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Comparar o perfil e frequência das mutações nos genes *rpoB* e *katG* (responsáveis pela resistência à INH e à RMP respectivamente), das cepas MR e não MR com o perfil genético encontrado e determinar se há associações.
- b) Determinar as relações genotípicas entre isolados provenientes das várias regiões do Brasil por IS6110-RFLP e spoligotyping.
- c) Através do spoligotyping, classificar as cepas de *M. tuberculosis* em determinadas famílias de acordo com o padrão encontrado.
- d) Traçar um perfil geográfico correlacionando as famílias com o perfil mutacional de *katG* e *rpoB*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As culturas de *M. tuberculosis*, os experimentos de extração de DNA, testes de sensibilidade para RMP, INH, PZA, EMB e ST e IS6110-RFLP foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do Centro de Referência Professor Helio Fraga (FIOCRUZ). Os sequenciamentos automáticos foram realizados no Laboratório de Genoma do Departamento de Bioquímica (DBq) no Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Os experimentos de genotipagem por spoligotyping Luminex® foram realizados no laboratório do Instituto de Genética e Microbiologia da Universidade Paris-Sud, Orsay, França.

#### 3.1 Isolados e teste de sensibilidade / identificação

As cepas de *M. tuberculosis* foram cedidas pela micobacterioteca do Laboratório de Micobacteriologia do Centro de Referência Prof. Helio Fraga. Este centro é referência nacional para diagnóstico e tratamento de Tuberculose MR. Possui ambulatório para pacientes MR e o Laboratório de Bacteriologia recebe material para cultura e teste de sensibilidade de pacientes do Estado do Rio de Janeiro e de diversos outros estados brasileiros.

Os testes de sensibilidade foram realizados em meio de cultura LJ, segundo o método das proporções descrito por Canetti *et al.*, 1963. As concentrações críticas de RMP e INH empregadas no teste de sensibilidade e as concentrações e proporções críticas de mutantes resistentes foram 40 µg/mL e 1.0% para RMP, 0.2 µg/mL e 1.0% para INH, 100 µg/mL e 10% para PZA, 4 µg/mL e 10% para St e 2.0 µg/mL e 1.0% para EMB (Silva *et al.*, 2001). Foram utilizados, como controle, isolados do mesmo grupo em que os testes de sensibilidade mostraram-se sensíveis à RMP, independentemente dos resultados para a INH e outros medicamentos.

Para a identificação da espécie *M. tuberculosis* foram acrescentados aos meios de cultura os agentes inibidores ácido p-nitrobenzóico - PNB e hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico -TCH (MS, 1994).

### 3.2 Culturas e extração do DNA

Foram utilizadas 99 culturas de Tuberculose MR e sete culturas que apresentaram sensibilidade à RMP. O material foi coletado entre 1995 e 2003. Estas cepas foram cultivadas em meio de Löenstein Jensen (LJ) e provinham de pacientes em que a maioria dos testes de sensibilidade demonstrou resistência à RMP e INH. Estas amostras foram obtidas de material de vias respiratórias e selecionadas da micobacterioteca do Laboratório do Centro de Referência.

A extração de DNA seguiu o protocolo sugerido por Van Embden *et al.* (1993). Foi feita a transferência das colônias do meio LJ para um tubo de 2 mL com 1 mL de água estéril. Em seguida, inativou-se o cultivo bacteriano pelo aquecimento à 80°C por 20 minutos em banho-maria (a inativação pode ser feita por no máximo 1 hora) e centrifugou-se por 5 minutos à 14000 rpm para que o sobrenadante fosse desprezado por aspiração com micropipeta. Foi adicionado 500 µL de tampão TE pH 8,0 e em seguida 50 µL de lisozima (5 mg/mL). Após agitação em vórtex, houve a incubação à 37°C por 1 hora. Foram então adicionados 70 µL de solução lauril sulfato de sódio (10%) e em seguida 6 µL de proteinase K (10 mg/mL). Após uma nova agitação em vórtex, foi feita a incubação à 65°C por 10 minutos. Mantendo as amostras à 65°C, foi adicionado 100 µL da solução de NaCl 5M e 80 µL da solução de CTAB (50 mM). O material foi incubado à 65°C por 10 minutos e 750 µL de clorofórmio foram adicionados aos tubos que foram em seguida agitados em vórtex por 30 segundos. O material foi centrifugado à 14000 rpm por 5 minutos e a fase superior (aquosa) foi transferida para um tubo de 1,5 mL (ao qual foram previamente adicionados 420 µL de isopropanol). Os tubos foram armazenados à -20°C por pelo menos 30 minutos ou por até 18 horas. Posteriormente, o DNA foi obtido após centrifugação à 14000 rpm por 20 minutos na temperatura de 4°C. O DNA sedimentado foi lavado com 250 µL de etanol a 75%, centrifugado à 14000 rpm por 5 minutos na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi aspirado e o DNA foi solubilizado em 40 µL de tampão TE, pH 8,0 e armazenado à -20°C.



### 3.3 Genotipagem por IS6110-RFLP

O genotipagem através de IS6110 RFLP foi conduzida nos isolados de acordo com sugerido por van Embden *et al.* (1993). O DNA dos isolados (5µg) foi digerido com a endonuclease de restrição PvuII (Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante. No dia seguinte, foi feita eletroforese por 12 horas em gel de agarose 1% com tampão TBE 1X (Tris Acido Borico -EDTA). O DNA foi transferido para uma membrana que foi hibridizada com uma sonda de 245 pb codificando parte do elemento IS6110. As autoradiografias foram escaneadas e o perfil de repetições de IS6110 foi analisado no programa Bionumerics (Windows version 4.0, Applied Maths). Marcadores internos foram utilizados para normalização das posições de IS6110 e a acurácia do procedimento foi verificada através da comparação do perfil de bandas da cepa de referência Mt.14323. Matrizes de similaridade foram construídas utilizando o coeficiente de similaridade de Dice com um intervalo de tolerância de 2,0% do comprimento padrão e dendrogramas foram gerados pelo método algoritmo de agrupamento (UPGMA).

### 3.4 Genotipagem por Spoligotyping Luminex®

O método de spoligotyping foi conduzido segundo o procedimento sugerido por Kamerbeek *et al* (1997). Foram utilizados os primers DRa (5' biotilado GGT TTT GGG TCT GAC GAC 3') e DRb (5' CCG AGA GGG GAC GGA AAC 3'), que anelam nas extremidades das sequencia DR, para amplificação das sequencias espaçadoras entre duas DRs. Para as reações de amplificação foram utilizados 100 ng de DNA, 20 pmoles de cada um dos primers, 200 µl de dNTP (Invitrogen), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). No termociclador, foi seguido o seguinte protocolo: temperatura de 95°C por 3 minutos, para desnaturação inicial do DNA, 25 ciclos de 95°C (30 segundos) - desnaturação, 65°C (30 segundos) - anelamento e 72°C (30 segundos) - extensão, terminando com 72°C por 5 minutos para extensão das fitas. Os produtos amplificados foram hibridizados com um conjunto de 43 oligonucleotídeos através do

programa com apenas um ciclo: 95°C por 10 minutos e 50°C por 20 minutos. Cada um dos 43 oligonucleotídeos corresponde a uma das sequências únicas dos espaçadores dentro do locus DR (Isogen, Bioscience BV, Holanda). Em seguida, a placa foi incubada a 50°C (temperatura de hibridização) por 5 minutos para que ocorresse a corrida na plataforma automatizada Luminex 200®. Os padrões gerados foram submetidos a um banco de dados do Instituto Pasteur de Guadeloupe (SITVIT2), que é uma versão mais recente do banco de dados SpolDB4 (disponível online <http://www.pasteur-guadeloupe.fr.8081/SITVITDemo>) (Brudey *et al*, 2006).

### 3.5 PCR e Sequenciamento

As técnicas de PCR e seqüenciamento foram realizadas no Laboratório de Genoma (IBRAG e Faculdade de Ciências Médicas - UERJ) que dispõe de um seqüenciador automático MegaBACE 1000 com 96 capilares. O DNA isolado de cada amostra foi visualizado em gel de agarose a 0,8%, para avaliação qualitativa de integridade e quantificado no espectrofotômetro (NanoVue Plus Spectrophotometer – GE Healthcare), utilizando-se 40 ng de cada amostra nas reações de PCR. Para amplificação da região central do gene *rpoB*, de 350 pares de base, compreendendo os códons de 445 a 560, foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos:

- *rpoB* senso: 5' CAT CGA CCA CTT CGG CAA CCG 3', posição 2171 a 2191 da seqüência de número de acesso do genbank L27989.
- *rpoB* anti-senso: 5' TTT CGA TCG GGC ACA TCC GGC 3', posição 2504 a 2524 da mesma seqüência acima.

Duas regiões do gene *katG* foram amplificadas: A primeira, de 414 pb, correspondendo ao N-terminal da proteína foi amplificada com os seguintes oligonucleotídeos:

- katG*1senso: 5' ACT TCG CGA TCA CAT CCG TG 3', posição 1921 a 1940 da seqüência de número de acesso do genbank U06258.
- katG*1anti: 5' GCG GCC GTC GTG GAT GCG GTA 3', posição 2315 a 2335 da seqüência de número de acesso do genbank U06258.

A segunda região, de 712 pb correspondendo ao meio da proteína foi amplificada com os seguintes oligonucleotídeos:

-katG2asenso: 5' CGG CGG TCA CAC TTT CGG TA 3', posição 2779 a 2798 da sequência de número de acesso do genbank U06258.

-katG2anti: 5' CCC GAC TTG TGG CTG CAG GC 3', posição 3471 a 3491 da sequência de número de acesso do genbank U06258.

Para a reação de amplificação (PCR) seguiu-se um protocolo padrão com a enzima Taq Platinum polimerase (Invitrogen), utilizando-se Tampão 1x (fornecido pelo fabricante), 0,1 Mm de dNTP (GE Healthcare), 50 ng dos primers senso e anti-senso (Operon) e o DNA a ser amplificado (40 ng). No termociclador (PCR Express Thermal Cycler – Thermo Hybaid), a amplificação foi iniciada com a temperatura de 96°C por cinco minutos, para desnaturação inicial do DNA, e 35 ciclos de 96°C (45s) - desnaturação, 63°C (45s) - anelamento para o gene *katG* e 72°C (1min) - extensão, terminando com 72°C por 10min para extensão das fitas. A temperatura de anelamento para o gene *rpoB* foi de 57° C. Após a reação, os produtos foram analisados em gel de agarose a 2%. Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para a reação de seqüenciamento feita por “cycle sequencing” com o kit específico (Die terminator) para o seqüenciador automatizado MegaBace 1000. Cada produto do PCR foi seqüenciado pelo menos 3 vezes nas duas direções.

Os cromatogramas resultantes foram processados nos programas Chromas 2, Staden pregap 4 e gap 4 para se obter uma seqüência de alta qualidade. Uma seqüência única (contig) foi montada a partir do programa CAP 3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). A seqüência final foi utilizada em um banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) para alinhamento com a seqüência de referência do gene *rpoB* (acesso no Gene Bank: L27989) e do gene *katG* (acesso no Gene Bank: U06258), para diagnóstico da mutação.

### 3.6 MabA-15 MAS-PCR

Foi realizada uma investigação em 8 isolados MR que não apresentaram mutação no gene *katG*. Para detecção simultânea do alelo específico do gene *katG* e da região promotora *inhA-15* (*MabA-15*) utilizamos um protocolo baseado no

estudo de Zhenhua Yang (2005). Foram utilizados os primers: *katGF* (4pmol) 5'GCAGATGGGGCTGATCTACG<sup>3'</sup> e *katGR* (4pmol) 5'ATACGACCTCGATGCCGC<sup>3'</sup>; *InhA-15F* (6 pmol) 5'GCGCGGTCAGTTCCACA<sup>3'</sup> e *InhA-15R* (6 pmol) 5'CACCCCGACAACCTATCG<sup>3'</sup>. Para a reação de amplificação (PCR) seguiu-se um protocolo padrão com a enzima Taq Platinum polimerase (Invitrogen), utilizando-se Tampão 10 vezes, 0,1 Mm de dNTP (GE Healthcare), 50 ng dos primers senso e anti-senso (Operon) e o DNA a ser amplificado (40 ng). No termociclador (PCR Express Thermal Cycler – Thermo Hybaid), a amplificação foi iniciada com uma desnaturação inicial de 96° C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de 95° C (50s) - desnaturação, 68° C (40s) - anelamento e 72° C (1min) - extensão, terminando com 72° C por 7 minutos para extensão das fitas. Após a reação, 10 µL dos produtos foram analisados em gel de agarose a 2,5 % tampão TBE 1X (tris-borate-EDTA), um marcador de peso molecular (100pb) foi usado para estimar o peso molecular do fragmento amplificado. Um fragmento de 292 pb indica o tipo selvagem (não mutado) no gene *katG* (códon) 315 e o fragmento de 270 pb indica o tipo selvagem para *inhA-15*.

### 3.7 Análise estatística

Os dados observados foram analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA). As associações entre as variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4 RESULTADOS

Foram analisados 106 amostras de isolados de pacientes do Centro de Referência Professor Helio Fraga. Entre estes isolados analisados, 99 eram resistentes à pelo menos RMP e INH, o que os define como MR. Sete destes isolados demonstraram sensibilidade à RMP, o que os desclassifica como MR, apesar de serem resistentes à INH. No entanto, o teste de sensibilidade para outras drogas de primeira linha também foi realizado (EMB e ST) e todas essas sete cepas apresentaram resistência à uma ou às duas drogas. Portanto, analisamos separadamente os 99 e os 7 isolados MR e não MR, respectivamente. Os testes de sensibilidade para PZA foram excluídos das análises, pois a maioria se demonstrou inconclusiva para esta droga.

Com relação aos 99 isolados MR analisados, todos apresentaram resistência à INH e RMP, enquanto 52 demonstraram resistência à EMB e 35 à ST (Tabela 1). Os resultados dos testes de sensibilidade para alguns isolados não puderam ser determinados devido à limitações do método utilizado (método das proporções).

Tabela 1 - Perfil de resistência para os 99 isolados MR analisados

| Perfil de resistência |     |     |    | n  |
|-----------------------|-----|-----|----|----|
| INH                   | RMP | EMB | ST |    |
| R                     | R   | S   | S  | 32 |
| R                     | R   | R   | R  | 25 |
| R                     | R   | R   | S  | 23 |
| R                     | R   | R   | ND | 4  |
| R                     | R   | ND  | ND | 3  |
| R                     | R   | S   | R  | 8  |
| R                     | R   | ND  | R  | 2  |
| R                     | R   | S   | ND | 2  |

R- Resistente

S- Sensível

ND-Não determinado

O resultado completo, para cada isolado, do teste de sensibilidade pode ser visualizado na Tabela 2. Como já mencionado anteriormente, os resultados para PZA foram excluídos das análises. No entanto, tais resultados estão discriminados na Tabela.

Tabela 2 - Perfil de resistência para cada um dos 99 isolados MR

| Número do<br>isolado | Perfil de resistência |     |     |    |     |
|----------------------|-----------------------|-----|-----|----|-----|
|                      | INH                   | RMP | EMB | ST | PZA |
| 111                  | R                     | R   | S   | S  | R   |
| 009                  | R                     | R   | R   | R  | R   |
| 039                  | R                     | R   | S   | S  | ND  |
| 1010                 | R                     | R   | R   | S  | ND  |
| 1085                 | R                     | R   | R   | ND | ND  |
| 1126                 | R                     | R   | R   | ND | ND  |
| 1194                 | R                     | R   | R   | R  | R   |
| 1205                 | R                     | R   | ND  | ND | ND  |
| 1221                 | R                     | R   | S   | S  | R   |
| 1251                 | R                     | R   | S   | S  | R   |
| 1264                 | R                     | R   | R   | S  | R   |
| 1269                 | R                     | R   | S   | S  | ND  |
| 1275                 | R                     | R   | S   | R  | ND  |
| 1314                 | R                     | R   | R   | S  | ND  |
| 1316                 | R                     | R   | R   | R  | S   |
| 1411                 | R                     | R   | R   | S  | ND  |
| 156                  | R                     | R   | ND  | R  | R   |
| 1576                 | R                     | R   | S   | S  | ND  |
| 1740                 | R                     | R   | R   | R  | R   |
| 2010/02              | R                     | R   | R   | R  | R   |
| 2010/97              | R                     | R   | R   | R  | R   |
| 2056                 | R                     | R   | R   | R  | R   |
| 2153                 | R                     | R   | R   | R  | R   |
| 2197                 | R                     | R   | S   | R  | ND  |
| 229                  | R                     | R   | S   | R  | ND  |
| 2316                 | R                     | R   | S   | S  | ND  |
| 232                  | R                     | R   | R   | ND | ND  |
| 235                  | R                     | R   | R   | S  | ND  |
| 2355                 | R                     | R   | R   | R  | ND  |
| 2410                 | R                     | R   | R   | R  | R   |
| 2414                 | R                     | R   | R   | S  | ND  |
| 2417                 | R                     | R   | S   | S  | ND  |
| 243                  | R                     | R   | R   | S  | ND  |
| 247                  | R                     | R   | R   | R  | ND  |
| 2475                 | R                     | R   | R   | R  | R   |
| 2505                 | R                     | R   | R   | S  | ND  |
| 262                  | R                     | R   | R   | R  | ND  |
| 263                  | R                     | R   | R   | R  | ND  |
| 265                  | R                     | R   | R   | S  | ND  |
| 2668                 | R                     | R   | R   | S  | R   |
| 2678                 | R                     | R   | R   | S  | ND  |
| 2688                 | R                     | R   | R   | S  | ND  |
| 2689                 | R                     | R   | R   | R  | ND  |

Tabela 2 - (continuação)

|      |   |   |    |    |    |
|------|---|---|----|----|----|
| 2697 | R | R | S  | S  | ND |
| 270  | R | R | S  | S  | ND |
| 274  | R | R | R  | S  | ND |
| 276  | R | R | S  | S  | ND |
| 2788 | R | R | R  | R  | ND |
| 2791 | R | R | R  | S  | ND |
| 294  | R | R | S  | R  | S  |
| 310  | R | R | R  | R  | ND |
| 314  | R | R | R  | S  | R  |
| 319  | R | R | S  | S  | R  |
| 32   | R | R | R  | S  | R  |
| 379  | R | R | S  | S  | ND |
| 415  | R | R | R  | R  | ND |
| 433  | R | R | R  | S  | ND |
| 480  | R | R | S  | S  | ND |
| 491  | R | R | S  | R  | ND |
| 529  | R | R | S  | S  | ND |
| 543  | R | R | S  | S  | ND |
| 563  | R | R | R  | S  | R  |
| 605  | R | R | ND | ND | S  |
| 640  | R | R | S  | ND | ND |
| 682  | R | R | S  | S  | ND |
| 711  | R | R | S  | S  | ND |
| 720  | R | R | R  | R  | R  |
| 78   | R | R | R  | R  | R  |
| 790  | R | R | S  | S  | ND |
| 826  | R | R | R  | ND | ND |
| 836  | R | R | S  | S  | ND |
| 837  | R | R | R  | R  | ND |
| 847  | R | R | R  | R  | ND |
| 850  | R | R | R  | R  | R  |
| 865  | R | R | S  | ND | ND |
| 884  | R | R | R  | S  | ND |
| 885  | R | R | R  | R  | ND |
| 886  | R | R | R  | S  | ND |
| 89   | R | R | ND | ND | R  |
| 933  | R | R | R  | S  | R  |
| 96   | R | R | ND | R  | ND |
| 972  | R | R | R  | S  | R  |
| 976  | R | R | R  | S  | ND |
| 981  | R | R | R  | R  | S  |
| 452  | R | R | S  | S  | S  |
| 358  | R | R | S  | S  | S  |
| 378  | R | R | S  | S  | S  |
| 02   | R | R | S  | R  | S  |

Tabela 2 (Continuação)

|     |   |   |   |   |   |
|-----|---|---|---|---|---|
| 155 | R | R | S | S | S |
| 150 | R | R | S | S | S |
| 231 | R | R | S | S | S |
| 285 | R | R | S | S | S |
| 107 | R | R | S | R | R |
| 03  | R | R | S | S | S |
| 07  | R | R | S | S | S |
| 11  | R | R | S | S | S |
| 76  | R | R | S | S | S |
| 261 | R | R | S | R | R |
| 88  | R | R | S | S | S |

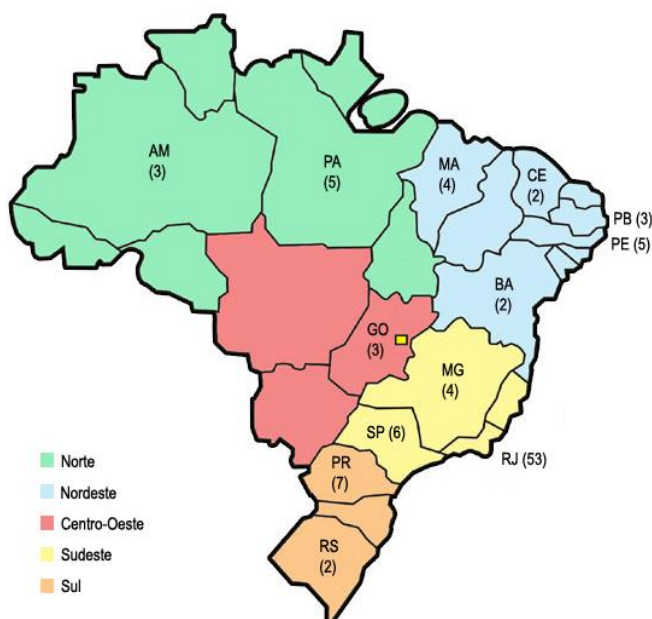
R – Resistente

S – Sensível

ND – Não determinado

Para os 99 isolados MR analisados, cinquenta e três eram provenientes de pacientes residentes do estado do Rio de Janeiro e 46 eram de pacientes residentes em outros 12 estados brasileiros (Amazonas: 3; Pará: 5; Maranhão: 4; Ceará: 2; Paraíba: 3; Pernambuco: 5; Bahia: 2; Goiás: 3; Minas Gerais: 4; São Paulo: 6; Paraná: 7 e Rio Grande do Sul: 2), cobrindo a maior parte do território brasileiro (Figura 10).

Figura 11 - Mapa do Brasil mostrando os diferentes estados e o número de isolados por estado (99 MR)





Com relação aos 99 isolados MR analisados, 91 (91,9%) apresentaram mutações na região RRDR de 81-pb do gene *rpoB*. Um total de 51 (51.5%), 23 (23.3%) e 11 (11.1%) isolados apresentaram mutações nos códons 531, 526 e 516, respectivamente, confirmando ser este segmento do gene uma região de maior probabilidade de ocorrência de mutações responsáveis pela resistência à RMP, como já observado em estudos anteriores (Höfling *et al*, 2005; Chan *et al*, 2007; Lipin *et al*, 2007). As frequências de ocorrências de mutações nos codons 531, 526 e 516 encontradas neste trabalho é similar ao observado ao redor do mundo (Valin *et al.*, 2000; Yue *et al.*, 2003; Jou *et al.*, 2005; Höfling *et al.*, 2005; Poudel *et al.*, 2012).

Três isolados não apresentaram mutações neste gene, apesar de serem resistentes à RMP. Os outros cinco isolados apresentaram mutações nos códons 471, 475, 539 e 545, geralmente associadas à outra mutação em um códon pertencente à região RRDR (Tabela 3).

Tabela 3 - Perfil de mutação para os genes *rpoB* e *katG* encontrado nos 99 isolados MR analisados

| Gene         | Mutação      |                              | Mudança de aminoácido | Nº de mutações |
|--------------|--------------|------------------------------|-----------------------|----------------|
|              | Códon mutado | Mutação específica           |                       |                |
| <i>rpoB</i>  | 531          | TCG - TTG                    | Ser - Leu             | 44             |
|              |              | TCG - TGG                    | Ser - Trp             | 7              |
|              | 513          | CAA - CCA                    | Gln - Pro             | 2              |
|              | 516          | GAC - GTC                    | Asp - Val             | 3              |
|              |              | GAC - TAC                    | Asp - Tyr             | 8              |
|              | 526          | CAC - GAC                    | His - Asp             | 9              |
|              |              | CAC - TAC                    | His - Tyr             | 8              |
|              |              | CAC - CGC                    | His - Arg             | 2              |
|              |              | CAC - TGC                    | His - Cys             | 2              |
|              |              | CAC - AAC                    | His - Asn             | 2              |
|              | 511          | CTG - CCG                    | Leu - Pro             | 4              |
|              | 475*         | GTG - GGG                    | Val - Gly             | 1              |
|              | 522*         | TCG - TTC                    | Ser - Phe             | 1              |
|              | 539*         | TCA - TTC                    | Ser - Phe             | 1              |
|              | 533          | CTG - CCG                    | Leu - Pro             | 1              |
|              | 545*         | CTG - CCG                    | Leu - Pro             | 2              |
|              | 508*         | ACC - CCC                    | Thr - Pro             | 1              |
|              | 471*         | ATG - ATT                    | Met - Ile             | 1              |
| <i>katG1</i> | 4            | Deleção (A) na posição 60    |                       | 26             |
|              | 65*          | Deleção (G) na position 241  |                       | 2              |
|              | 17*          | AGC - ACC                    | Ser - Thr             | 1              |
|              | 92-93*       | Inserção (T) na posição 325  |                       | 1              |
|              | 2*           | Deleção (C) na posição 54    |                       | 1              |
|              | 11*          | Deleção (C) na posição 81    |                       | 1              |
|              | 26*          | Deleção (G) na posição 126   |                       | 1              |
|              | 107          | Deleção (G) na posição 368   |                       | 1              |
|              | 67           | Deleção (G) na posição 249   |                       | 1              |
|              | 115*         | Iserção (T) na posição 392   |                       | 1              |
|              | 1*           | GTG - GCG                    | Val - Ala             | 1              |
|              | 93           | GCC- ACC                     | Ala - Thr             | 1              |
| <i>katG2</i> | 315          | AGC - ACC                    | Ser - Thr             | 75             |
|              |              | AGC - AAC                    | Ser - Asn             | 3              |
|              |              | AGC - ACA                    | Ser - Thr             | 3              |
|              |              | AGC - ATC                    | Ser - Ile             | 1              |
|              | 463          | CGG - CTG                    | Arg -Leu              | 2              |
|              | 431          | Deleção (G) na posição 1293  |                       | 1              |
|              | 399*         | GAA - GAG                    | Glu - Glu             | 2              |
|              | 493*         | Deleção (A) na posição 1525  |                       | 1              |
|              | 439          | Inserção (G) na posição 1365 |                       | 1              |
|              | 485*         | Deleção (G) na posição 1501  |                       | 1              |

\*associado com outro codon mutado

Sete isolados apresentaram mutações duplas e o isolado 2153 (em destaque na Tabela 4) apresentou mutação tripla (códon 531, 522 e 539), onde um dos códons mutados invariavelmente pertencia ao grupo de maior frequência (531, 526 ou 516) (Tabela 4). Podemos observar nas Tabelas 3 e 4 que, além dos três códons mais frequentemente mutados, foram encontradas mutações em outros nove códons: 513, 475, 522, 539, 511, 533, 545, 508 e 471. Destes, os mais frequentes foram o 511 (4 isolados), 513 e 545 (2 isolados cada). Algumas destas mutações encontram-se fora da região RRDR, nos códons: 471, 475 e 545. Com exceção da mutação no códon 545 que em uma cepa foi encontrada isoladamente, estes códons apresentaram-se sempre associados à mutação de maior frequência, na região RRDR (códon 531).

Neste trabalho, foram descritos 4 novos alelos para o gene *rpoB*, nos códons 471, 475, 539 e 545. Três destes ocorreram como mutações duplas e, conforme dito acima, envolvendo sempre um dos códons mais frequentemente mutados. Destes novos alelos, 3 eram provenientes do Estado do Rio de Janeiro enquanto a mutação do códon 471 foi encontrada em um isolado pertencente ao Estado de Pernambuco. Mutações nos códons 471, 475 e 539 nunca foram antes descritas na literatura. No entanto, já foi observada uma mutação no códon 545 (Leu CTG para Met ATG) (Aslan *et al*, 2008). Porém a mudança de aminoácido encontrada no presente trabalho (Leu CTG para Pro CCG) é inédita, o que configura um novo alelo (em destaque na Tabela 4).

Na Tabela 4, podemos observar detalhadamente todas as mutações encontradas para os dois genes analisados para cada isolado. Através dela, observamos as mutações (mutações pontuais, inserções e deleções) e a ausência das mesmas, que ocorreram concomitantemente nos genes, bem como em suas regiões. Algumas mutações não causam diretamente a resistência, por exemplo, polimorfismos e mutações silenciosas.

**Tabela 4:** Perfil de mutação para os 99 isolados MR analisados.

| Nº do Isolado | Gene         |                       |              |  |              |                       |
|---------------|--------------|-----------------------|--------------|--|--------------|-----------------------|
|               | <i>rpoB</i>  |                       |              | <i>katG1</i>                           |              |                       |
|               | Codon Mutado | Mutação de aminoácido | Codon Mutado | Mutação de aminoácido                  | Codon Mutado | Mutação de aminoácido |
| 111           | 513          | Gln CAA - Pro CCA     | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 09            | 531          | Ser TCG - Trp TGG     | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 39            | 516          | Asp GAC - Val GTC     | --           | nenhuma mutação                        | --           | nenhuma mutação       |
| 1010          | 531          | Ser TCG - Leu TTG     | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 1085          | 516          | Asp GAC - Tyr TAC     | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 1126          | 531          | Ser TCG - Leu TTG     | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 1194          | 526          | His CAC - Asp GAC     | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 1205          | 531          | Ser TCG - Leu TTG     | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
|               | 475          | Val GTG - Gly GGG     | --           | nenhuma mutação                        |              |                       |
| 1221          | 531          | Ser TCG - Leu TTG     | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 1251          | --           | nenhuma mutação       | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 1264          | 531          | Ser TCG - Leu TTG     | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 1269          | 531          | Ser TCG - Leu TTG     | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 1275          | 516          | Asp GAC - Tyr TAC     | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 1314          | --           | nenhuma mutação       | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - ASN AAC     |
| 1316          | 531          | Ser TCG - Leu TTG     | 4 + 65       | 4 (Del A) + 65 (Del G)                 | --           | nenhuma mutação       |
| 1411          | 531          | Ser TCG - Leu TTG     | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 156           | 531          | Ser TCG - Leu TTG     | 17 + 92-93   | 17 (Ser AGC - Thr ACC) + 92-93 (Ins T) | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 1576          | 531          | Ser TCG - Leu TTG     | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 1740          | 531          | Ser TCG - Leu TTG     | 2 + 4 + 11   | 2 (Del C) + 4 (Del A) + 11 (Del C)     | 431          | Del (G)               |
| 2010/02       | 531          | Ser TCG - Leu TTG     | 4            | 4 (Del A)                              | --           | nenhuma mutação       |
| 2010/97       | 513          | Gln CAA - Pro CCA     | --           | nenhuma mutação                        | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |
| 2056          | 526          | His CAC - Asp GAC     | 4            | 4 (Del A)                              | 315          | Ser AGC - Thr ACC     |

Tabela 4: Continuação

|      |                   |   |             |                                     |           |   |
|------|-------------------|---|-------------|-------------------------------------|-----------|---|
| 2153 | 531<br>522<br>539 | Ser TCG - Leu TTG<br>Ser TCG - Phe TTC<br>Ser TCA - Phe TTC | --          | nenhuma mutação                     | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2197 | 526               | His CAC - Tyr TAC   | 4 + 26 + 65 | 4 (Del A) + 26 (Del G) + 65 (Del G) | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 229  | 531               | Ser TCG - Leu TTG   | 107         | 107 (Del G)                         | --        | nenhuma mutação                                   |
| 2316 | 531               | Ser TCG - Leu TTG   | 4           | 4 (Del A)                           | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 232  | 531               | Ser TCG - Trp TGG   | 4           | 4 (Del A)                           | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 235  | 531               | Ser TCG - Trp TGG   | 4           | 4 (Del A)                           | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2355 | 526               | His CAC - Arg CGC   | 4           | 4 (Del A)                           | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2410 | 526               | His CAC - Cys TGC   | --          | nenhuma mutação                     | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2414 | 511               | Leu CTG - Pro CCG   | 4           | 4 (Del A)                           | 315 + 463 | 315 (Ser AGC - Thr ACC) + 463 (CGG Arg - CTG Leu) |
| 2417 | 531               | Ser TCG - Leu TTG   | --          | nenhuma mutação                     | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 243  | 531               | Ser TCG - Trp TGG   | --          | nenhuma mutação                     | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 247  | 516               | Asp GAC - Tyr TAC   | --          | nenhuma mutação                     | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2475 | 531               | Ser TCG - Leu TTG   | --          | nenhuma mutação                     | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2505 | 531               | Ser TCG - Leu TTG   | --          | nenhuma mutação                     | 315       | Ser AGC - Thr ACA (2 nucleotídes)                 |
| 262  | 526               | His CAC - Tyr TAC   | 4           | 4 (Del A)                           | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 263  | 531               | Ser TCG - Leu TTG   | --          | nenhuma mutação                     | 315 + 399 | 315 (Ser AGC - Thr ACC) + 399 (Glu GAA - Glu GAG) |
| 265  | 531               | Ser TCG - Leu TTG   | --          | nenhuma mutação                     | 315 + 493 | 315 (Ser AGC - Thr ACC) + 493 (Del A)             |
| 2668 | 531               | Ser TCG - Leu TTG   | 4           | 4 (Del A)                           | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2678 | 531               | Ser TCG - Leu TTG   | 67          | 67 (Del G)                          | --        | nenhuma mutação                                   |
| 2688 | 516               | Asp GAC - Val GTC   | 4           | 4 (Del A)                           | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2689 | 526               | His CAC - Asp GAC   | --          | nenhuma mutação                     | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2697 | --                | nenhuma mutação   | --          | nenhuma mutação                     | --        | nenhuma mutação                                   |
| 270  | 531               | Ser TCG - Leu TTG   | --          | nenhuma mutação                     | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 274  | 531               | Ser TCG - Leu TTG   | --          | nenhuma mutação                     | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 276  | 531               | Ser TCG - Leu TTG   | 4           | 4 (Del A)                           | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2788 | 516               | Asp GAC - Tyr TAC   | --          | nenhuma mutação                     | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |

Tabela 4: Continuação

|      |     |                   |         |                                   |           |   |
|------|-----|-------------------|---------|-----------------------------------|-----------|---|
| 2791 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | --      | nenhuma mutação                   | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 294  | 526 | His CAC - Tyr TAC | --      | nenhuma mutação                   | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 310  | 526 | His CAC - Tyr TAC | --      | nenhuma mutação                   | 439       | Ins G   |
| 314  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | --      | nenhuma mutação                   | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 319  | 533 | Leu CTG - Pro CCG | 4       | 4 (Del A)                         | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 32   | 526 | His CAC - Asp GAC | --      | nenhuma mutação                   | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 379  | 531 | Ser TCG - Trp TGG | --      | nenhuma mutação                   | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 415  | 526 | His CAC - Asp GAC | --      | nenhuma mutação                   | --        | nenhuma mutação                                   |
| 433  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | 4 + 115 | 4 (Del A) + 115 (Ins T)           | --        | nenhuma mutação                                   |
| 480  | 526 | His CAC - Asn AAC | 4       | 4 (Del A)                         | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 491  | 516 | Asp GAC - Tyr TAC | 4       | 4 (Del A)                         | 315       | Ser AGC - Thr ACA (2 nucleotides)                 |
| 529  | 526 | His CAC - Tyr TAC | 4       | 4 (Del A)                         | 315       | AGC - Thr ACC                                     |
| 543  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | 4       | 4 (Del A)                         | 315 + 399 | 315 (Ser AGC - Thr ACC) + 399 (Glu GAA - Glu GAG) |
| 563  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | --      | nenhuma mutação                   | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 605  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | --      | nenhuma mutação                   | 463       | Arg CGG - Leu CTG                                 |
| 640  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | 4       | 4 (Del A)                         | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 682  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | --      | nenhuma mutação                   | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 711  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | --      | nenhuma mutação                   | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 720  | 531 | Ser TCG - Trp TGG | --      | nenhuma mutação                   | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 78   | 531 | Ser TCG - Leu TTG | --      | nenhuma mutação                   | --        | nenhuma mutação                                   |
| 790  | 545 | Leu CTG - Pro CCG | 1 + 4   | 1 (Val GTG - Ala GCG) + 4 (Del A) | --        | nenhuma mutação                                   |
| 826  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | --      | nenhuma mutação                   | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 836  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | --      | nenhuma mutação                   | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 837  | 526 | His CAC - Asn AAC | 4       | 4 (Del A)                         | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 847  | 511 | Leu CTG - Pro CCG | --      | nenhuma mutação                   | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 850  | 516 | Asp GAC - Tyr TAC | 4       | 4 (Del A)                         | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 865  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | --      | nenhuma mutação                   | 315 + 485 | 315 (Ser AGC - Thr ACC) + 485 (Del G)             |

Tabela 4: Continuação

|     |     |                   |    |                   |     |                   |
|-----|-----|-------------------|----|-------------------|-----|-------------------|
| 884 | 526 | His CAC - Tyr TAC | 93 | Ala GCC - Thr ACC | —   | nenhuma mutação   |
| 885 | —   | nenhuma mutação   | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Asn AAC |
| 886 | 508 | Thr ACC - Pro CCC | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 89  | 526 | His CAC - Tyr TAC | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 933 | 511 | Leu CTG - Pro CCG | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 96  | 531 | Ser TCG - Trp TGG | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 972 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 976 | 516 | Asp GAC - Val GTC | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 981 | 526 | His CAC - Arg CGC | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 452 | 511 | Leu CTG - Pro CCG | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 358 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | 4  | 4 (Del A)         | —   | nenhuma mutação   |
| 378 | 526 | Ser TCG - Leu TTG | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Asn AAC |
| 02  | —   | nenhuma mutação   | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 155 | —   | nenhuma mutação   | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 150 | 526 | His CAC - Asp GAC | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 231 | 526 | His CAC - Asp GAC | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 285 | —   | nenhuma mutação   | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 107 | —   | nenhuma mutação   | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 03  | 516 | Asp GAC - Tyr TAC | 4  | 4 (Del A)         | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 07  | 471 | Met ATG - Ile ATT | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Ile ATC |
| 11  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | —  | nenhuma mutação   | —   | nenhuma mutação   |
| 76  | 526 | His CAC - Tyr TAC | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 261 | 526 | His CAC - Asp GAC | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |
| 88  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | —  | nenhuma mutação   | 315 | Ser AGC - Thr ACC |

Com relação ao gene *katG*, duas regiões foram sequenciadas e nomeadas como *katG1* e *katG2*, a última contendo o codon 315, que é o mais frequentemente mutado (Höfling *et al*, 2005 ; Chan *et al*, 2007 ; Valvatne 2009 ; Afanas'ev *et al*, 2007; Araya *et al*, 2011; Kozhamkulov *et al*, 2011).

Para os 99 isolados MR analisados, foram encontradas mutações em 92 (93 %) sendo que 7 apresentaram mutações apenas na primeira região analisada (*katG1*). Entre estes 92 isolados, 82 carregavam mutações no codon 315 e 5 tiveram mutações duplas na segunda região analisada (*katG2*) nos codons 463, 399, 493 ou 485, acompanhadas por mutações no codon 315 (Tabela 7). Embora já tenham sido descritas na literatura alterações de aminoácidos no codon 431 (Cardoso *et al*, 2004), neste trabalho foi encontrada uma deleção de um nucleotídeo para este códon (em destaque na Tabela 4), o que caracteriza, conforme mencionado acima, um novo alelo para este gene. Trinta (30,3 %) isolados MR, apresentaram mutações no *katG1*. Destes, 26 possuíam deleções no codon 4. Os outros 4 isolados apresentaram inserções, deleções e mutações. Os resultados completos para mutações nos genes *rpoB* e *katG* encontram-se na Tabela 4.

Como podemos observar mais detalhadamente na Tabela 4, dos 99 isolados MR analisados, 69 não apresentaram mutações na região *katG1*. Nos outros 30 isolados, como mostrado na Tabela 3, houve 33 deleções de nucleotídeos. A maioria foi uma deleção do último nucleotídeo do códon 4, que esteve presente 21 vezes isoladamente e em 5 isolados associada com outras mutações. Apenas 2 inserções e 3 mutações pontuais foram registradas.

Na região *katG2*, entre os 99 isolados MR, ocorreram 2 mutações isoladas no códon 463, de Arginina (CGG) para Leucina (CTG). Este alelo é considerado apenas como um polimorfismo (Hijjar, 2008). Nos outros 98 isolados houve 3 deleções, 1 inserção e 86 mutações pontuais, sendo 82 no códon 315 (82,8 %). A mutação Serina (AGC) para Treonina (ACC) ocorreu 75 vezes (70 vezes como forma isolada e cinco vezes associada a mutações em outros códons). A mutação Serina (AGC) para Asparagina (AAC) aconteceu 3 vezes, para Treonina (ACA) três e para Isoleucina (ATC) uma vez. Nesta mesma região houve duas mutações silenciosas no códon 399, de Ácido Glutâmico (GAA) para Ácido Glutâmico (GAG), associadas à outra mutação, responsável pela resistência à INH.

Três isolados MR não apresentaram mutações nos genes *katG* e *rpoB* e 6 outros foram resistentes à RMP mas não apresentaram mutações no gene *rpoB*.



Embora a maioria dos isolados analisados neste trabalho seja proveniente do Estado do Rio de Janeiro, apenas um destes 6 isolados pertencia à este estado. Além disso, 4 outros isolados resistentes à INH não possuíam mutações no gene *katG*. É possível que alguns destes isolados possuam outros mecanismos de resistência à INH, como bombas de efluxo que causam a extrusão de compostos estrutural e funcionalmente não relacionados através de bombas transportadoras, por exemplo. Este mecanismo pode ser responsável pela resistência intrínseca e adquirida à drogas em células procarióticas e eucarióticas (da Silva *et al*, 2011).

No entanto, com relação à aquisição de resistência à INH, mutações em outros genes podem estar envolvidas. Por esta razão, nós também investigamos se estes isolados resistentes à INH, porém sem mutações no gene *katG*, apresentavam mutações na região *mabA*-15 do gene *inhA*. Entre os 8 isolados analisados através de reação de PCR multiplex alelo-específico (MAS-PCR), apenas um mostrou-se mutado nesta região. Mutações que ocorrem até o 15<sup>o</sup> nucleotídeo precedente ao operon *mabA-inhA* são responsáveis por resistência à INH devido à um mecanismo de titulação que gera a superprodução do alvo da droga, sendo responsável por 8-30 % das cepas resistentes (Siu *et al*, 2011). Mutações em outros genes são raras e, geralmente, coexistem com outras mutações em regiões “hotspots” dos genes *katG* e *mabA-inhA* (Siu *et al*, 2011).

Com o objetivo de avaliar se as frequências e tipos de mutações sofrem influência das associações de isolados em diferentes grupos genotípicos, nós investigamos possíveis relações genéticas através do IS6110 – RFLP. O número de cópias da sequência IS6110 observado variou de 2 a 18 com uma média de 10 cópias. Vinte e cinco isolados foram agrupados formando 11 grupos com 2 ou 3 isolados com perfis idênticos de RFLP (Table 8). Os outros 74 isolados MR mostraram padrões únicos de IS6110 e não foram encontradas associações com as frequências de mutações para cada códon mutado ou com o perfil de sensibilidade.

Tabela 5 - Grupos genotípicos de IS6110-RFLP e suas mutações para os genes *rpoB* e *katG*

| Cluster | Nº do isolado | Perfil de resistência | Mutação no <i>rpoB</i> | Mutação no <i>katG</i> |
|---------|---------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 1       | 2316/02       | INH, RMP              | Ser531Leu              | Ser315Thr, Del 4       |
|         | 2410/02PA*    | INH, RMP, EMB, ST     | His526Cys              | Ser315Thr              |
| 2       | 235/03        | INH, RMP, EMB         | Ser531Trp              | Ser315Thr, Del 4       |
|         | 243/03        | INH, RMP, EMB         | Ser531Trp              | Ser315Thr              |
| 3       | 274/03        | INH, RMP, EMB         | Ser531Leu              | Ser315Thr              |
|         | CE02          | INH, RMP, ST          | NM                     | Ser315Thr              |
|         | MG 285        | INH, RMP              | NM                     | Ser315Thr              |
| 4       | 009/03        | INH, RMP, EMB, ST     | Ser531Trp              | Ser315Thr              |
|         | 720/03        | INH, RMP, EMB, ST     | Ser531Trp              | Ser315Thr              |
| 5       | 2475/02       | INH, RMP, EMB, ST     | Ser531Leu              | Ser315Thr              |
|         | 682/03        | INH, RMP              | Ser531Leu              | Ser315Thr              |
| 6       | 1275/03       | INH, RMP, ST          | Asp516Tyr              | Ser315Asn              |
|         | 2010/97       | INH, RMP, EMB, ST     | Gln513Pro              | Ser315Thr              |
|         | 865/03        | INH, RMP              | Ser531Leu              | Ser315Thr/Del 485      |
| 7       | 1194/03       | INH, RMP, EMB, ST     | His526Asp              | Ser315Thr              |
|         | 529/03MA      | INH, RMP              | His526Tyr              | Ser315Thr, Del 4       |
| 8       | 847/03        | INH, RMP, EMB, ST     | Leu511Pro<br>Asp516Tyr | Ser315Thr              |
|         | 850/03        | INH, RMP, EMB, ST     | Asp516Tyr              | Ser315Thr, Del 4       |
| 9       | 1010/03       | INH, RMP, EMB         | Ser531Leu              | Ser315Thr              |
|         | PE76          | INH, RMP              | His526Tyr              | Ser315Thr              |
|         | PA107         | INH, RMP, ST          | NM                     | Ser315Thr              |
| 10      | 1221/03       | INH, RMP              | Ser531Leu              | Ser315Thr              |
|         | 480/03        | INH, RMP              | His526Asn              | Ser315Thr, Del 4       |
| 11      | 1269/03       | INH, RMP              | Ser531Leu              | Ser315Thr              |
|         | 276/03        | INH, RMP              | Ser531Leu              | Ser315Thr, Del 4       |

NM- Nenhuma mutação na região estudada.

\*O estado de origem de cada isolado está indicado como PA-Pará; MA-Maranhão; CE-Ceará; MG-Minas Gerais e PE-Pernambuco.

Todos os outros isolados são provenientes do Rio de Janeiro.

Dois dos grupos formados (grupo 4 e grupo 5) com 2 isolados cada mostraram um perfil de resistência similar e apresentaram mutações nos códons 531 e 315 dos genes *rpoB* e *katG*, respectivamente. No entanto, vale lembrar que estas duas mutações são as mais frequentemente encontradas nestes genes, logo, não podemos afirmar que este perfil semelhante entre os isolados do cluster 4 e do 5

seja determinante para considerarmos se tratar da mesma cepa. Ou seja, pode ter havido uma cepa MR circulante entre estes pacientes, mas também é possível que o perfil idêntico de mutações se deva a maior probabilidade destas ocorrerem, mesmo estando os isolados com idêntico padrão de repetições *IS6110*. Além disso, no cluster 5, o perfil de resistência foi diferente para cada isolado com relação ao EMB e ST.

Quando observamos os outros nove grupos formados no RFLP, não foi possível detectar relações entre mutações ou perfis de resistência. As mutações encontradas nos genes *rpoB* e *katG* apresentam algumas diferenças entre isolados de um mesmo grupo. Alguns grupos apresentam isolados com mutação no mesmo códon, mas que possuem mudanças de aminoácidos distintas (grupos 6 e 7). Em outros grupos, foram observadas, para seus isolados, diferentes mutações para o gene *rpoB* (grupos 1, 3, 6, 8, 9, 10). Curiosamente, a deleção do codon 4 que, conforme observamos é relativamente comum, foi encontrada em apenas um isolado de cada grupo (com dois isolados cada) (grupos 1, 2, 7, 8, 10 e 11) (Tabela 5). Além disso, os grupos 1, 3, 7 e 9 são formados por isolados de diferentes estados brasileiros.

Outro método de genotipagem que utilizamos foi o spoligotyping (Figura 10A). Para identificar todos os padrões de spoligotyping, nós utilizamos uma versão mais recente do banco de dados SpolDB4, o SITVIT2 do Instituto Pasteur de Guadeloupe. Uma amostra é classificada como nova (new) quando não apresenta um Spoligotype International Type (SIT), o que representa padrões partilhados por dois ou mais isolados. Portanto, um spoligotype definido como new é aquele que nunca foi reportado anteriormente. Já os isolados classificados como desconhecidos (unknown) possuem um número de SIT mas a linhagem (família) a qual ele pertence é desconhecida.

Com relação aos 99 isolados MR analisados, 82 foram classificados em 5 diferentes famílias (Figura 11A). Quarenta e seis pertencem à família Latin-America and Mediterranean (LAM), 17 à família T, 12 à família Haarlem (H), 6 à família X2 e 1 à família East African Indian (EAI). Os outros 17 isolados foram classificados como novos (9 isolados) e desconhecidos (8 isolados). Análises estatísticas revelaram que não há diferenças significativas com relação à frequência de ocorrência de famílias entre isolados do estado do Rio de Janeiro e os isolados dos outros estados ( $p=0.43$ ). Isto indica, que nossas amostras são representativas de isolados MR que

ocorrem no país como um todo, podendo, assim, serem utilizadas para um desenho de perfil genético e consequente desenvolvimento de testes diagnósticos para tuberculose MR em todo o Brasil (Tabela 6).

Figura 12 - Famílias (A) e subfamílias das principais famílias (B e C) determinadas por spoligotyping

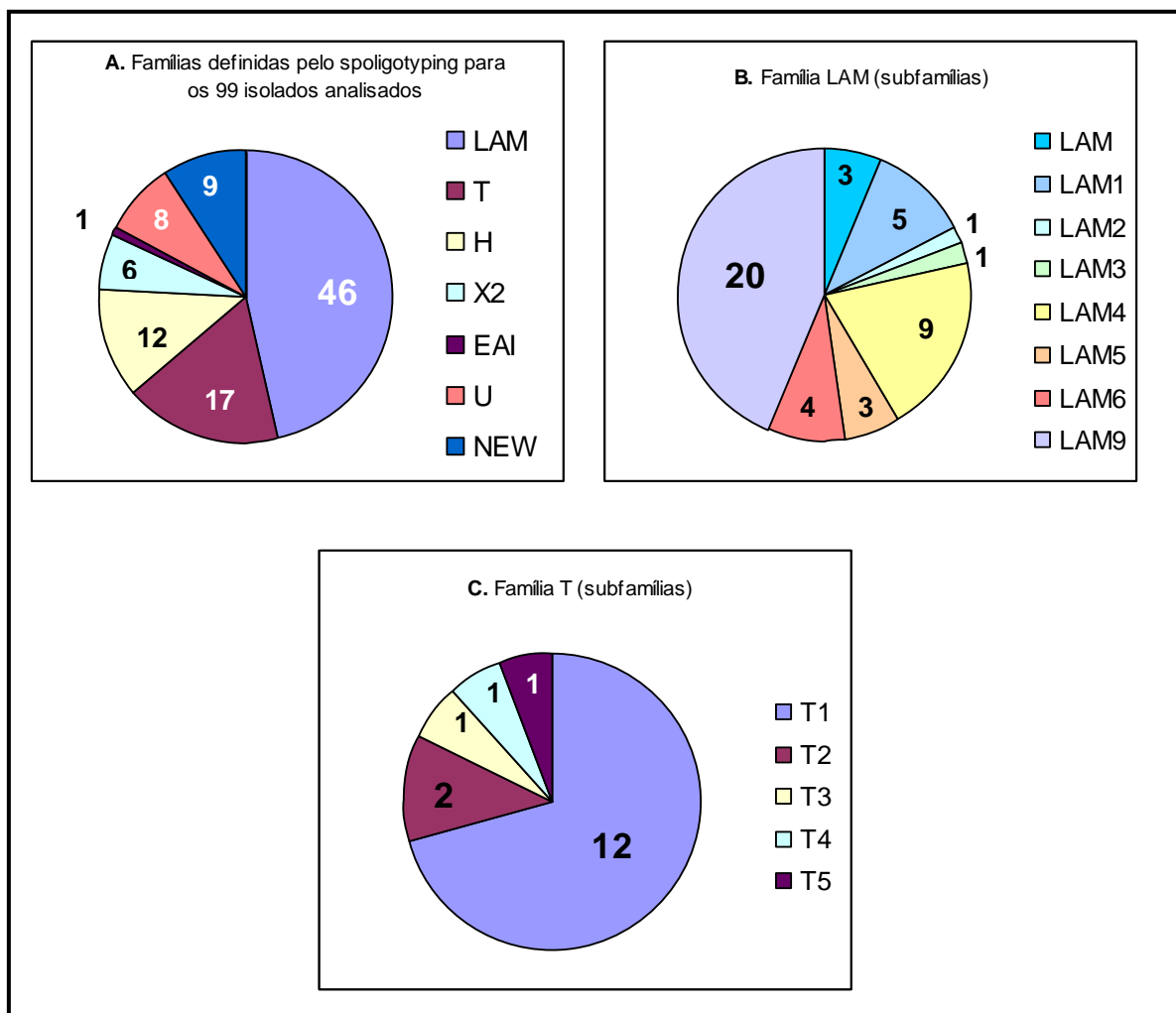


Tabela 6 - Dados demográficos e incidência da tuberculose em diferentes regiões do Brasil

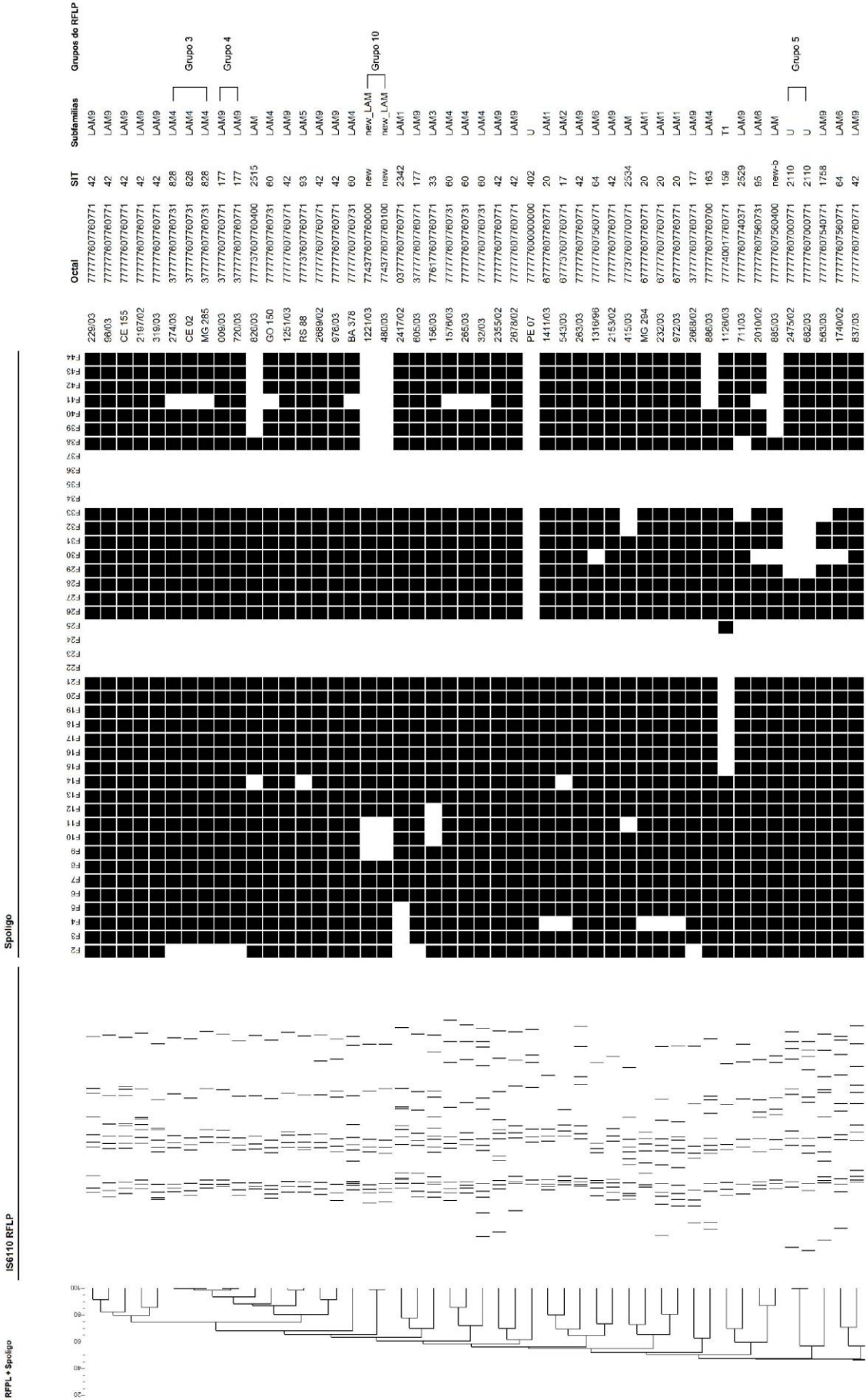
| Regiões do Brasil | Estados           | População <sup>a</sup> | Incidência de tuberculose <sup>b</sup> | Nº (%) de isolados no estudo |
|-------------------|-------------------|------------------------|--|------------------------------|
| Norte             | Amazonas          | 3,221,939              | 66.71                                  | 3 (3,0%)                     |
|                   | Pará              | 7,065,573              | 45.78                                  | 5 (5,0%)                     |
| Nordeste          | Ceará             | 8,185,286              | 41.99                                  | 2 (2,0%)                     |
|                   | Pernambuco        | 8,485,386              | 47.81                                  | 5 (5,0%)                     |
|                   | Maranhão          | 6,118,995              | 39.73                                  | 4 (4,0%)                     |
|                   | Paraíba           | 3,641,395              | 27.56                                  | 3 (3,0%)                     |
|                   | Bahia             | 14,080,654             | 41.25                                  | 2 (2,0%)                     |
| Centro-oeste      | Goiás             | 5,647,035              | 14.59                                  | 3 (3,0%)                     |
| Sudeste           | Minas Gerais      | 19,273,506             | 23.99                                  | 4 (3,0%)                     |
|                   | Rio de Janeiro    | 15,420,375             | 73.27                                  | 53 (53,53%)                  |
|                   | São Paulo         | 39,827,570             | 36.51                                  | 6 (6,0%)                     |
| Sul               | Paraná            | 10,284,503             | 24.70                                  | 7 (7,0%)                     |
|                   | Rio Grande do Sul | 10,582,840             | 41.51                                  | 2 (2,0%)                     |

<sup>a</sup>Fonte: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/en/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=1065> (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, população em 2007)

<sup>b</sup> Fonte: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2009/d0202.def> (Indicadores e Dados Básicos-IDB, incidência da Tuberculose em 2007)  
Taxa de incidência: casos novos/100.000 habitantes

Os isolados pertencentes às famílias LAM e T foram distribuídos em 8 e 5 subfamílias, respectivamente (Figura 10B e 10C). Com relação à família LAM, a subfamília com maior frequência de ocorrência foi a LAM9 (20 isolados), seguida pela subfamília LAM4 (9 isolados). Para a família T, a subfamília T1 foi a mais frequente com 12 isolados. Já a família H, foi subdividida nas subfamílias H1 e H3 com 2 e 10 isolados, respectivamente. Os resultados da genotipagem, tanto por *IS6110*-RFLP, quanto por spoligotyping (com número octal, SIT e família) para cada isolado MR podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7. Associações entre os grupos gerados através do IS6110 - RFLP e Spoligotyping





Os 11 grupos obtidos com o *IS6110*-RFLP foram confrontados com os resultados do spoligotyping (Tabela 8). Como esperado, isolados que foram agrupados por RFLP eram membros da mesma subfamília. Realizamos uma análise pareada no programa Bionumerics dos resultados obtidos a partir do *IS6110*-RFLP e spoligotyping. Esta análise nos permitiu uma verificação mais acurada dos grupos com o mesmo padrão de repetição *IS6110*. Como podemos observar na Tabela 8, nos grupos 10 e 11 formados a partir do RFLP, os isolados apresentaram novos SITs, apesar de terem sido classificados como LAM através no número octal. Os isolados do grupo 11, por exemplo, possuíam um perfil idêntico de repetições *IS6110*, o mesmo número octal com idêntico perfil de presença ou ausência de repetições DR e foram classificados como membros da subfamília LAM3.



Tabela 8. Grupos por IS6110-RFLP e seus respectivos Spoligotipings.

| Grupo RFLP | Nº do Isolado | Família (Spoligotyping) | IS6110 RFLP | (SIT) Número do Octal e descrição do Spoligotyping |
|------------|---------------|-------------------------|-------------|--|
| 1          | 2316/02       | T1                      |             | (53) 77777777760771                                |
|            | 2410/02       | T1                      |             | (53) 77777777760771                                |
| 2          | 235/03        | T1                      |             | (1202) 000000003760771                             |
|            | 243/03        | T1                      |             | (1202) 000000003760771                             |
| 3          | 274/03        | LAM4                    |             | (828) 377777607760731                              |
|            | CE02          | LAM4                    |             | (828) 377777607760731                              |
|            | MG285         | LAM4                    |             | (828) 377777607760731                              |
| 4          | 009/03        | LAM9                    |             | (177) 377777607760771                              |
|            | 720/03        | LAM9                    |             | (177) 377777607760771                              |
| 5          | 2475/02       | U                       |             | (2110) 777777607000771                             |
|            | 682/03        | U                       |             | (2110) 777777607000771                             |
| 6          | 1275/03       | X2                      |             | (18) 677776777760601                               |
|            | 2010/97       | X2                      |             | (18) 677776777760601                               |
|            | 865/03        | X2                      |             | (18) 677776777760601                               |
| 7          | 1194/03       | H3                      |             | (50) 777777777720771                               |
|            | 529/03        | H3                      |             | (50) 777777777720771                               |
| 8          | 847/03        | H3                      |             | (746) 77777777520771                               |
|            | 850/03        | H3                      |             | (746) 77777777520771                               |
| 9          | 1010/03       | X2                      |             | (439) 777376777760601                              |
|            | PE76          | X2                      |             | (439) 777376777760601                              |
|            | PA107         | X2                      |             | (439) 777376777760601                              |
| 10         | 1221/03       | NEW / LAM               |             | (new) 774377607760000                              |
|            | 480/03        | NEW / LAM               |             | (new) 774377607760000                              |
| 11         | 1269/03       | NEW / LAM3              |             | (new) 376177605760771                              |
|            | 276/03        | NEW / LAM3              |             | (new) 376177605760771                              |

Apenas os grupos formados no RFLP

Quando comparamos as mutações encontradas nos genes *katG* e *rpoB* para as famílias definidas pelo spoligotyping, encontramos algumas relações interessantes (Tabela 9). Embora a deleção no códon 4 da primeira região do gene *katG* (*katG1*) seja comum em nossos isolados, a família X2 foi a única que não apresentou esta deleção. No entanto, esta família foi a única que apresentou a mutação no codon 315 da segunda região do gene *katG* (*katG2*) para todos os membros. Ao observarmos o padrão mutacional para a família H, notamos que o gene *rpoB* apresenta um perfil atípico, sendo os códons 516, 526 e 531 os mais frequentemente mutados, respectivamente. No entanto, para os outros isolados, os codons mais frequentemente alterados coincidiram com os dados normalmente encontrados em estudos de resistência à RMP em diversos países e regiões (codons 531, 526 e 516).

Tabela 9 - Associação entre famílias do spoligotyping e mutações nos genes *rpoB* e *katG* para os 99 isolados MR

| Característica         | Nº (%)* de isolados    |            |           |           |           | Total |
|------------------------|------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-------|
|                        | Família do spoligotype |            |           |           |           |       |
|                        | LAM (46) <sup>#</sup>  | T (17)     | H (12)    | X2 (6)    | EAI 1 (1) |       |
| A.mutação <i>rpoB</i>  |                        |            |           |           |           |       |
| 531                    | 27 (58,7%)             | 11 (57,9%) | 1 (7,7%)  | 2 (33,3%) | 0 (0%)    | 41    |
| 526                    | 11 (23,9%)             | 2 (10,5%)  | 4(30,8%)  | 1 (16,7%) | 1 (25%)   | 19    |
| 516                    | 1 (2,2%)               | 2 (10,5%)  | 6(46,1%)  | 1 (16,7%) | 0 (0%)    | 10    |
| Outras mutações        | 6 (13%)                | 2 (10,5%)  | 2 (15,4%) | 1 (16,7%) | 0 (0%)    | 11    |
| B.mutation <i>katG</i> |                        |            |           |           |           |       |
| 315                    | 37 (80,4%)             | 13 (72,2%) | 9 (75,0%) | 6 (100%)  | 1 (100%)  | 66    |
| Del 4                  | 11 (23,9%)             | 6 (33,3%)  | 4 (30,8%) | 0 (0%)    | 1 (100%)  | 22    |
| Outras mutações        | 14 (30,4%)             | 3 (15,8%)  | 1 (7,7%)  | 1 (16,7%) | 0 (0%)    | 20    |
| Total (A+B)            | 107                    | 39         | 27        | 12        | 3         | 189   |

\*A porcentagem de mutações refere-se ao número de isolados que apresentaram aquela mutação em relação ao número total de isolados para a família em questão. Os tipos classificados como novos ou desconhecidos foram excluídos desta tabela. <sup>#</sup>Total de isolados em cada família.

As duas principais famílias encontradas através do spoligotyping foram LAM (46%) e T (17%). Nós comparamos estas duas famílias com seus respectivos perfis mutacionais (Tabela 10) e encontramos algumas associações interessantes entre alterações no *katG1* e as subfamílias. LAM6 e LAM9 mostraram um número bem mais alto de deleções nesta região (*katG1*) quando comparadas com outras subfamílias da família LAM ( $p = 0,008$ ). LAM, LAM4 e LAM 5, por exemplo, não apresentaram nenhuma mutação nesta região. Além disso, todos os isolados

pertencentes às famílias LAM e T tiveram mutações no códon 315 do gene *katG2*. Outra observação interessante é que a família T apresenta uma diversidade de mutações menor tanto para o gene *rpoB* quanto para o gene *katG* quando comparada à família LAM.

**Tabela 10.** Subfamílias das duas famílias com maior número de ocorrências determinadas pelo spoligotyping e seus respectivos perfis mutacionais

| Subfamília | Nº de isolados | Mutações no <i>rpoB</i>  | Mutações no <i>katG1</i> #                                 | Mutações no <i>katG2</i> # |
|------------|----------------|--|--|----------------------------|
| LAM        | 3              | 531 (2)*, 526 (1)  | NIM  | 315 (2)                    |
| LAM 1      | 5              | 531 (3), 526 (2), 511 (1)                                      | Del 4 (1)  | 315 (5)                    |
| LAM 2      | 1              | 531 (1)  | Del 4 (1)  | 315 e 399 (1)              |
| LAM 3      | 1              | 531 (1)  | 17, ins 92-93 (1)  | 315 (1)                    |
| LAM 4      | 9              | 531 (3), 526 (4), 508 (1)                                      | NIM  | 315 (9), 493 (1)           |
| LAM 5      | 3              | 531 (2)  | NIM  | 315 (2)                    |
| LAM 6      | 4              | 531 (4)  | Del 2 (1), Del 4 (3), Del 11 (1), Del 65 (1)               | 315 (1), Del 431 (1)       |
| LAM 9      | 20             | 531 (11), 526 (4), 516 (1), 522 (1), 539 (1), 545 (1), 533 (1) | Del 4 (6), Del 26 (1), Del 65 (1), Del 67 (1), Del 107 (1) | 315 (16), 399 (1), 463 (1) |
| T 1        | 12             | 531 (8), 526 (2), 516 (1), 513 (1)                             | Del 4 (3)  | 315 (9), 439 (1)           |
| T 2        | 2              | 531 (2)  | Del 4 (1), ins 115 (1)                                     | 315 (1)                    |
| T 3        | 1              | 516 (1)  | Del 4 (1)  | 315 (1)                    |
| T 4        | 1              | 511 (1)  | Del 4 (1)  | 315 e 463 (1)              |
| T 5        | 1              | 531 (1)  | NIM  | 315 (1)                    |

NIM – Nenhuma mutação

#Mutações no *katG1* e mutações *katG2* refere-se à mutações na primeira e na segunda região do gene analisada, respectivamente. Os números entre parênteses referem-se ao número de vezes que cada mutação aparece.

Na Tabela 11 podemos observar o padrão de resistência para os sete isolados que demonstraram sensibilidade à RMP.

Tabela 11 - Padrão de resistência dos 7 isolados sensíveis à RMP analisados

| Padrão de resistência |     |     |    |   |
|-----------------------|-----|-----|----|---|
| INH                   | RMP | EMB | ST | n |
| R                     | S   | R   | S  | 3 |
| R                     | S   | S   | R  | 2 |
| R                     | S   | R   | R  | 2 |

R- Resistente  
S- Sensível

Na Tabela 12 está demonstrado o perfil de mutações para a primeira e segunda região do gene *katG* analisadas nestas amostras.

Tabela 12 - Perfil de mutações para o gene *katG* encontradas nos 7 isolados sensíveis à RMP

| Gene         | Mutação      |                           |                       | n |
|--------------|--------------|---------------------------|-----------------------|---|
|              | Codon mutado | Mutação específica        | Mudança de aminoacido |   |
| <i>katG1</i> | 4            | Deleção (A) na posição 60 |                       | 1 |
| <i>katG2</i> | 315          | AGC - ACC                 | Ser – Thr             | 3 |
|              | 315          | AGC - AAC                 | Ser – Asn             | 1 |
|              | 341*         | TGG - GGG                 | Trp - Gly             | 1 |
|              | 463          | CGG - CTG                 | Arg -Leu              | 4 |

\*associada com mutação em outro códon

A Tabela 13 nos mostra um perfil completo destes 7 isolados, com os resultados do teste de sensibilidade, sequenciamento e spoligotyping. Nela podemos observar um fato interessante: no total de isolados analisados neste trabalho (106) obtivemos 4 da família EAI (1 da subfamília EAI1 e 3 da subfamília EAI5). Todos os 3 isolados pertencentes a EAI5 fazem parte do grupo sensível à RMP. Poderíamos pensar na hipótese de ter havido uma transmissão cruzada, já que os 3 isolados são provenientes do Estado do Rio de Janeiro. No entanto, esta hipótese pode ser descartada já que as 3 cepas possuem perfis de RFLP totalmente distintos.

Além disso, como podemos observar na Tabela 13, a subfamília EAI5 carrega mutações preferencialmente no códon 463 do gene *katG*, associada com

outra mutação no códon 315 ou no códon 341. A mutação no códon 463, ao contrário da mutação no códon 315, não é comumente encontrada, o que pode configurar uma associação deste tipo de mutação com isolados da subfamília EAI5 que sejam sensíveis à RMP. No presente estudo, por exemplo, para os 99 isolados MDR, apenas 2 apresentaram mutação no códon 463. No entanto, seriam necessários estudos adicionais com um maior número de isolados com sensibilidade à RMP pertencentes à subfamília em questão para que esta observação fosse confirmada.

Como revelado nas análises de genotipagem por spoligotyping, um isolado proveniente do Estado do Rio de Janeiro pertence à família Beijing (Tabela 13), que é extremamente virulenta. No entanto, este fato não é alarmante já que este genótipo foi encontrado em um único isolado.

**Tabela 13 - Perfil de genotipagem encontrado para os 7 isolados sensíveis à RMP**

| Nº do isolado | Estado de origem | Perfil de Resistência |     |     |    | Mutação no <i>katG</i> |                               | Família |
|---------------|------------------|-----------------------|-----|-----|----|------------------------|-------------------------------|---------|
|               |                  | INH                   | RMP | EMB | ST | <i>katG1</i>           | <i>katG2</i>                  |         |
| 501           | RJ               | R                     | S   | R   | S  | --                     | --                            | LAM9    |
| 24            | RJ               | R                     | S   | R   | S  | --                     | 463 (Arg-Leu)                 | Beijing |
| 405           | RJ               | R                     | S   | S   | R  | --                     | 315 (Ser-Thr)                 | H4      |
| 2525          | RJ               | R                     | S   | R   | S  | --                     | 315 (Ser-Thr) e 463 (Arg-Leu) | EAI5    |
| 5794          | RJ               | R                     | S   | R   | R  | --                     | 315 (Ser-Thr) e 463 (Arg-Leu) | EAI5    |
| 7011          | RJ               | R                     | S   | R   | R  | --                     | 341 (Trp-Gly) e 463 (Arg-Leu) | EAI5    |
| 792           | RJ               | R                     | S   | S   | R  | Del 4                  | 315 (Ser-Asn)                 | T1      |

## 5 DISCUSSÃO

A Tuberculose MR, por representar uma séria ameaça ao controle da tuberculose, deve ser investigada e tratada com muita cautela. Muitos estudos definem como MR cepas que no teste de sensibilidade foram resistentes à INH e RMP. Neste trabalho, demonstramos a necessidade de serem testadas outras drogas de primeira linha no tratamento da tuberculose antes que determinada cepa seja considerada MR. Santos *et al* (2010) analisou 132 cepas de *M. tuberculosis* do centro-oeste do Brasil e classificou estas cepas como MR ou não apenas através do teste de sensibilidade para INH e RMP. Eles consideraram 8 isolados como MR por serem resistentes à RMP e INH. No entanto, eles também tiveram um isolado resistente apenas à RMP e 9 resistentes à INH mas sensíveis à RMP. Telenti *et al* (1997) analisou 95 isolados e como 71 eram resistentes à INH e RMP, estas amostras foram classificadas como MDR. Porém, eles também tiveram 18 amostras que eram resistentes à INH ou RMP. Como nós mostramos, estes isolados podem ser resistentes à outras drogas de primeira linha. Portanto, testes de sensibilidade para outros fármacos deveriam ter sido realizados. Esta classificação de resistência é importante por influenciar fortemente no tratamento a ser seguido. Em suma, nós demonstramos que o conceito internacional de tuberculose MR precisa ser visto com prudência quando for decidido o tratamento a ser seguido pelo paciente.

Nós observamos, entre nossos isolados não MR, uma ocorrência da família Beijing. Não é a primeira vez que esta cepa extremamente virulenta é observada no Brasil. Um trabalho com 420 cepas de uma região pobre de São Paulo, em que havia 22 amostras MR e outras 72 obtidas de pacientes HIV positivos, mostrou um grupo genotípico de quatro isolados com genótipo Beijing, sendo dois deles MR. A multirresistência dos 22 casos estava associada à não aderência ao tratamento, mesmo entre os casos HIV positivos. A resistência primária foi muito baixa (Telles *et al.*, 2005). Com exceção de alguns países da África, não existe correlação entre infecção por HIV e tuberculose MR na população em geral, como tem sido descrito em microepidemias de tuberculose MR e HIV em países com baixa incidência de

tuberculose. Esta associação é encontrada em populações restritas em presídios ou em clínicas para pacientes HIV positivos. A frequência, no Brasil, da associação entre tuberculose MR e HIV é de 8% (Baptista *et al.*, 2002).

Chan *et al* (2007) encontraram uma cepa com mutação no códon 516 do gene *rpoB* (Asp516Tyr) que demonstrou sensibilidade à RMP, enquanto 3 outras cepas com essa mesma mutação eram resistentes à essa droga. Estes autores observaram que mutações idênticas podem ser ocasionalmente associadas à variados fenótipos de resistência, encontrando níveis de resistência variáveis para a mesma mutação. É possível que duas cepas carreguem a mesma mutação, mas tenham características fenotípicas em níveis variados se estas possuírem diferentes tipos de mutações compensatórias. No entanto, nós sugerimos que os resultados de Chan *et al* (2007) sejam verificados no que diz respeito à mutações que carregam fenótipos reversos de resistência, principalmente com relação à Asp516Tyr no gene *rpoB*. Nós obtivemos 8 mutações deste tipo, com todos os isolados demonstrando resistência à RMP.

Foram descritos, neste trabalho, 4 novos alelos para o gene *rpoB*. Sandgren *et al* (2009) criaram um web site interativo que permite aos usuários visualizar todas as mutações específicas já descritas associadas com resistência para cada droga. Entre estes, se encontram os genes *rpoB* e *katG*, logo, este banco de dados será enriquecido com os achados deste trabalho. O fácil acesso a estas informações sobre os mecanismos de resistência à drogas ajuda no desenvolvimento de novos e rápidos métodos de diagnóstico, bem como na descoberta de novas drogas.

A deleção no códon 4 foi detectada em alta frequência na primeira região do gene *katG*, que não é comumente estudada. Este fato foi observado por nosso grupo e publicado anteriormente (Siqueira *et al* 2009), onde descrevemos o perfil de mutações para *katG1* e *katG2* de 97 isolados MR, dos quais 64 foram incluídos neste trabalho. Os outros 35 isolados tiveram estas regiões sequenciadas para o presente estudo, formando um total de 99 isolados MR.

O perfil mutacional encontrado neste trabalho para os genes *rpoB* e *katG*, responsáveis por grande parte da resistência à RMP e INH respectivamente, foi semelhante aos obtidos em outros estudos ao redor do mundo. Além disso,



descrevemos novas mutações nos isolados MR que nos permitiu traçar um perfil genético com associações de isolados coletados em um período de oito anos e provenientes de diferentes estados brasileiros. Estes resultados podem contribuir para o desenvolvimento de testes rápidos de diagnóstico que poderão simultaneamente detectar a tuberculose e a MR através de novas estratégias como, por exemplo, o HRM (desnaturação de alta resolução) em qPCR, onde através da curva de dissociação podemos identificar se o tipo de mutação investigada está presente ou não e assim inferir a resistência à droga em questão.

Nove entre os onze grupos genotípicos encontrados no RFLP mostraram diferentes perfis de mutação para os genes *rpoB* e/ou *katG*. Os resultados da genotipagem por *IS6110*-RFLP indicam que a transmissão da mesma cepa entre os pacientes aconteceu antes que o fenótipo de MR estivesse estabelecido, sugerindo uma aquisição independente de resistência aos antibióticos para estes isolados. Além disso, quatro dos onze grupos encontrados (grupos 1, 3, 7 e 9) agruparam isolados de diferentes estados brasileiros, indicando que a mesma cepa pode ter circulado livremente entre as regiões do Brasil. É possível que tenha havido uma transmissão destas cepas circulantes e uma posterior aquisição da resistência às drogas. Logo, nossos dados não apontam para uma transmissão de cepas MR entre os pacientes que fosse alarmante para o período de 1996 a 2003 no Brasil.

A alta taxa de polimorfismo de *IS6110*-RFLP, indicando aquisição independente de resistência entre os 99 isolados MR analisados, não nos surpreende visto que a resistência secundária (adquirida) é a principal causa do desenvolvimento de MDR em nossas amostras. O oposto foi observado por Perizzolo *et al* (2012), onde isolados MR coletados em dois hospitais independentes do Rio Grande do Sul foram genotipados e demonstraram uma alta porcentagem de agrupamento, concluindo que estes pertenciam principalmente à cepas que tinham sido transmitidas entre os pacientes nos últimos anos.

Como resultado da genotipagem por spoligotyping, encontramos como famílias de maior ocorrência no Brasil, a família LAM (46,5%), a família T (17,2%) e a família H (12,1%). Estes resultados são semelhantes a outro estudo realizado recentemente (Gomes *et al*, 2011), também através de spoligotyping, para

amostras de *M. tuberculosis* nacionais, onde as principais famílias encontradas foram LAM, T e H, com frequências semelhantes as encontradas em nossos isolados MR. Curiosamente, em nossos isolados, a família EAI, esteve representada por um isolado entre as amostras MR e por 3 isolados entre as amostras não MR. Esta família é filogeograficamente específica do sudeste da Ásia, Índia e leste da África. Este fato é indicativo de que deve ter havido uma transmissão destas cepas entre diferentes continentes.

Nós observamos que alguns isolados dentro do mesmo cluster do *IS6110*-RFLP e que pertenciam à mesma família determinada pelo spoligotyping eram provenientes de estados brasileiros diferentes e mostraram variados perfis mutacionais. Isto fortalece a idéia de que houve uma aquisição independente de resistência à drogas entre estes isolados.

Quando comparamos o perfil mutacional encontrado dentro das famílias de tuberculose MR analisadas, observamos que a família X2 foi a única que não apresentou deleção do códon 4 para o gene *katG1* (deleção encontrada com frequência em nossos isolados MR) em nenhum dos seus representantes. Fizemos uma análise estatística comparando para presença ou ausência de deleção no códon 4 para todas as famílias com o número de ocorrências. No entanto, devido ao baixo número de isolados pertencentes à família X2, não alcançamos significância ( $p=0,17$ ). Estudos adicionais serão necessários para que esta hipótese seja confirmada e para que possamos determinar se, em países com alta taxa de ocorrência desta família, a mutação no códon 4 não precise ser considerada para testes diagnósticos ou investigativos.

A família H, como pode ser observado na Tabela 9, apresentou uma inversão do códon mais frequentemente mutado. Para todas as outras famílias o códon 531 apresentou o maior número de mutações, o que já está extensamente descrito em estudos prévios. No entanto, a família H, apresentou maior número de mutações no códon 516, seguido pelo 526 e 531. Esta inversão na frequência alcançou significância estatística ( $p<0.0001$ ) e achamos que deve ser levada em consideração em análises laboratoriais que envolvam investigações relacionadas à esta família.

Um estudo analisou 217 isolados MR de *M. tuberculosis* da Rússia através de spoligotyping, *IS6110*-RFLP e perfil de mutações nos genes *katG* e *rpoB* (Lipin et al, 2007). Entre estes isolados, 46%, 10% e 2% pertenceram à família LAM, H e T, respectivamente. Os isolados da família LAM obtiveram, como principais códons mutados para o gene *rpoB*, o 516 (75%) e 531 (7%) e, para o gene *katG*, o códon 315 (99%). No presente estudo, 46,5% dos isolados MR pertenceram a família LAM com uma alta frequência de mutações no códon 315 (82,6%), assim como encontrado nos isolados da Rússia. No entanto, para o gene *rpoB*, nós observamos o códon 531 mutado em 60,9% dos isolados, enquanto apenas 2,2% apresentaram alterações no códon 516.

Com relação à família H, Lipin et al. (2007) não encontraram nenhuma mutação no gene *katG* em 43% dos isolados MR da Rússia enquanto, para nossos isolados MR, esta porcentagem foi de 16,7%. Esta diferença significativa também foi observada para o gene *rpoB*, onde 48% dos isolados da Rússia não apresentaram mutações, enquanto apenas 8,3% dos nossos isolados MR não possuíam alterações nesse gene. Esta comparação sugere que podem ocorrer diferenças regionais relacionadas à frequência de mutações específicas para determinados códons quando comparados isolados pertencentes à uma mesma família. Com relação a um outro estudo realizado no Brasil (Perizzolo et al, 2012), nossos resultados foram semelhantes. Neste estudo, entre 121 isolados MR do estado do Rio Grande do Sul, 20% e 12% não apresentaram mutações nos genes *katG* e *rpoB*, respectivamente.

Para nossos isolados MR, a família H, apresentou o códon 516 como mais frequentemente mutado enquanto o mesmo não foi observado nos isolados da Rússia. Além disso, Lipin et al. (2007), encontraram apenas 4 (1,8%) membros da família T nos isolados da Rússia, enquanto esta porcentagem foi de 17,2% para os nossos isolados MR. Outra diferença significativa entre os isolados da família T analisados por nós e por Lipin et al. (2007) é com relação à mutação no códon 531 do gene *katG*. Enquanto este não apresenta nenhuma mutação para os isolados da Rússia, ele foi o mais frequentemente mutado entre nossos isolados. Estas diferenças reforçam a hipótese de que a frequência de determinadas mutações em famílias específicas depende da região geográfica a qual os isolados pertencem.

Perizzolo *et al.* (2012) também observaram uma porcentagem pequena de membros da família H (4.1%) em estudos com pacientes com *M. tuberculosis* MR do estado do Rio Grande do Sul quando comparado a outros estudos realizados com populações de cepas sensíveis provenientes de isolados deste mesmo estado. No entanto, nós observamos uma porcentagem significativa de cepas pertencentes à família H para nossos isolados MR brasileiros (12%), o que sugere que esta diferença deve ocorrer apenas quando o Rio Grande do Sul é analisado separadamente dos outros estados brasileiros.

Perizzolo *et al.* (2012) também observaram que a subfamília com maior frequência de ocorrência foi a LAM5 (15% das cepas estudadas), o que é raramente observado em amostras sensíveis à drogas desta mesma região do Brasil. Em nosso estudo, a frequência de ocorrência da subfamília LAM5 foi baixa (3%), mostrando um comportamento similar ao encontrado em amostras sensíveis do Rio Grande do Sul e reforçando o sugerido por Perizzolo *et al.* (2012), que provavelmente ocorreu uma transmissão de cepas MR entre os isolados dos pacientes analisados por ele. Com relação ao tipo de mutação encontrado para isolados da subfamília LAM5, os resultados dos dois estudos são bastante similares, com um isolado que não apresentou mutação e mutações nos códons 531 e 315 dos genes *rpoB* e *katG*, respectivamente, para todos os outros isolados. O perfil de mutações nesta subfamília parece ser bastante similar entre os isolados brasileiros.

Ao observarmos o comportamento do perfil mutacional das subfamílias pertencentes às duas famílias mais frequentes entre nossos 99 isolados MR, notamos claramente uma maior frequência de deleções na região *katG1* nas subfamílias LAM6 e LAM9. Esta observação alcançou significância estatística quando analisada a presença ou ausência de deleções no gene *katG1* para as diferentes subfamílias LAM ( $p=0,008$ ).

Apesar de observarmos na Tabela 10 que a diversidade de mutações para os dois genes analisados é maior para a família LAM quando comparado à família T, não podemos afirmar que este seja um comportamento característico destas duas famílias, pois não alcançamos significância estatística, tanto para o gene

*rpoB* ( $p=0,5$ ) quanto para o gene *katG* ( $p=1,0$ ), quando comparamos a diversidade de mutações das famílias T e LAM.

A tuberculose MR é uma séria ameaça mundial no que diz respeito ao controle da doença. Os testes de sensibilidade para drogas de primeira linha exercem forte influência na determinação do tratamento a ser seguido. A rápida detecção de resistência a drogas anti-tuberculostáticas é um componente essencial para que este controle ocorra. Neste trabalho, descrevemos o perfil de mutações para genes relacionados à resistência à duas das três principais drogas envolvidas no tratamento da tuberculose, RMP e INH. Além disso, descrevemos mutações não observadas em estudos prévios, o que auxiliará a área clínica no desenvolvimento de testes diagnósticos. Foram realizadas também correlações entre os perfis de resistência, os resultados obtidos a partir do *IS6110*-RFLP e entre mutações nos genes analisados, para que fossem determinadas possíveis associações. Nós observamos que isolados pertencentes ao mesmo grupo genotípico, determinado pelo padrão de repetições *IS6110*, não necessariamente apresentam o mesmo perfil de resistência ou mutacional, indicando que esta genotipagem não pode prever a resistência da cepa analisada. Este tipo de investigação pode ser otimizada pelo método Luminex® de spoligotyping (o Spoligorifotyping), desenvolvido recentemente, que permite a identificação simultânea das principais mutações para o gene *rpoB* (códon 531, 526 e 516), das principais mutações em genes relacionados à resistência à INH (*katG* 315, *inhA* -15) e spoligotyping (Gomgnimbou *et al*, 2012).

Apesar da maioria dos isolados analisados neste trabalho ter sido proveniente do estado do Rio de Janeiro, foram analisados isolados de outros 11 estados brasileiros, conforme mostrado na Figura 10. Desta maneira, nós pudemos avaliar o comportamento e perfil genético para todo o território nacional.

Embora a resistência à INH esteja associada à alguns genes, principalmente *katG*, *inhA* e *ahpC*, nossas análises mostraram que mutações no gene *katG* são bastante relevantes como indicadores da resistência à essa droga pois, com relação aos nossos isolados MR, 93% apresentaram mutações no códon 315, onde houve uma predominância da mutação específica Ser315Thr (89% dos isolados mutados no gene *katG*). Esses resultados corroboram com os

encontrados em outros países (Afanas'ev *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2007; Valvatne *et al.*, 2009; Araya *et al.*, 2011; Kozhamkulov *et al.*, 2011) e com estudos prévios realizados em isolados MR brasileiros (Cardoso *et al.*, 2004; Höfling *et al.*, 2005; Perizzolo *et al.*, 2012).

Afanas'ev *et al.* (2007) analisou 412 cepas de *M. tuberculosis* da Rússia e percebeu que 76.9% das cepas resistentes à INH apresentaram mutações no códon 315 do gene *katG*. Araya *et al.* (2011) analisaram 28 isolados MR de *M. tuberculosis* do Chile e obtiveram 73% das cepas resistentes à INH mutadas no códon 315. Kozhamkulov *et al.* (2011) encontraram 98.4% das cepas resistentes à INH mutadas no códon 315 em isolados provenientes de Cazaquistão (Europa). Estes resultados são consistentes com os encontrados também no Brasil. Cardoso *et al.* (2004) encontrou mutações no gene *katG* em 85.6% dos 97 isolados resistentes à INH analisados sendo que 61.9% destas ocorreram no códon 315. Höfling *et al.* (2005) encontraram a substituição Ser315Thr em 60.4% dos isolados MR. Um estudo publicado em 2010 (Santos *et al.*), encontrou uma baixa prevalência de mutações em cepas brasileiras no códon 315 do gene *katG* em relação aos outros estudos, levantando a questão a respeito da variação desta prevalência ser influenciada pela distribuição geográfica. No entanto, nós analisamos diversas regiões do Brasil e os códons mais frequentemente mutados mantiveram um padrão.

Estudos têm demonstrado que as mutações do tipo Ser315Thr ocorrem mais frequentemente em cepas MR do que em cepas resistentes apenas à INH e, além disso, que esta mutação não produz uma alteração no fitness bacteriano (Silva & Palomino., 2011). Neste trabalho, nós analisamos 7 cepas não MR, com sensibilidade para RMP mas resistência à INH e resistência à EMB ou ST ou ambos (Tabela 1). Assim, pudemos observar que cepas não MR, mas que também não são monorresistentes à INH, não se comportam como estas últimas com relação à alteração Ser315Thr, tendo sido observado que, entre as sete cepas, três apresentaram este tipo de mutação (Tabela 3), o que a descaracteriza como incomum.

Santos *et al.*, 2010, encontraram uma baixa incidência de mutações no códon 315 do gene *katG* (6 em 17) em isolados brasileiros resistentes à INH

provenientes de Goiás, levantando a questão de que diferenças geográficas entre as cepas podem ser responsáveis por variações nas predominâncias de mutações. No entanto, como dito anteriormente, nós analisamos isolados de diversos estados brasileiros e obtivemos perfis de mutações semelhantes aos observados mundialmente. Além disso, entre nossos 99 isolados MR, o estado de Goiás estava representado por 3 isolados. Dentre estes, dois apresentaram a substituição Ser315Thr e apenas um não apresentou mutação nesta segunda região do gene *katG* (*katG2*).

Outro ponto interessante que podemos destacar ao observarmos os isolados do estado de Goiás separadamente do restante dos isolados analisados neste trabalho, é que, apesar de um deles não ter demonstrado mutação na primeira região do gene *katG* (*katG1*), nos outros dois foi identificada uma deleção no códon 65 (associada à outras) que não foi observada em qualquer outro isolado analisado neste trabalho (tanto MR quanto não MR). Ou seja, pode ser que esta deleção no gene *katG1* (que não é habitualmente analisado, como o gene *katG2*) seja muito mais frequente, ou até mesmo característica, para o estado de Goiás do que para os outros estados.

Esta observação é reforçada pelo fato destes três isolados não terem sido classificados dentro de grupos genotípicos pela técnica de *IS6110*-RFLP. Ou seja, como apresentam perfis genéticos distintos, apesar de serem cepas provenientes do mesmo estado, podemos descartar a hipótese de ter havido uma transmissão cruzada entre um paciente que já apresentasse a cepa com deleção no códon 65 e outro paciente que estivesse adquirindo esta cepa já mutada. Além disso, conforme pode ser observado na Tabela 7, estes três isolados também pertenceram a grupos distintos com relação à técnica de spoligotyping (apresentaram número de SIT variados) e foram classificados em subfamílias diferentes (LAM4, LAM6 e LAM9). No entanto, seriam necessários estudos adicionais com maior número de isolados deste estado para que esta observação alcançasse um respaldo estatístico. A Tabela 13 permite que estes dados obtidos para o estado de Goiás sejam mais facilmente visualizados. O único isolado que não apresentou a deleção no códon 65, mostrou sensibilidade tanto para EMB quanto para ST, enquanto os outros eram ou resistentes à estes dois

medicamentos (isolado número 1316) ou sensíveis a EMB mas resistentes à ST (isolado número 2197).

Tabela 14 - Perfil de mutações encontradas para o estado de Goiás

| Nº do isolado | Estado de origem | Gene e códon mutado |                      |              |
|---------------|------------------|---------------------|----------------------|--------------|
|               |                  | <i>rpoB</i>         | <i>katG1</i>         | <i>katG2</i> |
| 150           | GO               | His526Asp           | NM                   | Ser315Thr    |
| 1316          | GO               | Ser531Leu           | Del4, Del 65         | NM           |
| 2197          | GO               | His526Tyr           | Del4, Del 26, Del 65 | Ser315Thr    |

NM – Nenhuma mutação

Segundo Costa *et al* (2009), existe uma associação entre a mutação no codon 315 do gene *katG* e a família H em isolados da América do Sul (Brasil, Peru e Argentina) mas esta associação não é observada para a família LAM. Porém, nós obtivemos uma alta frequência de mutações no códon 315 para estas duas famílias. Embora a mutação Ser315Thr resulte em uma enzima sem capacidade de ativar a INH (que é uma pré-droga), ela conserva aproximadamente 50% da atividade catalase-peroxidase (Rouse *et al*; 1996). Portanto, esta enzima alterada resulta em altos níveis de resistência à INH, porém mantendo um nível de proteção oxidativa, o que cria uma vantagem para os isolados com esta mutação. Possivelmente este tipo de mutação produz um ótimo balanço entre a atividade diminuída de catalase e nível suficiente de atividade da peroxidase, o que daria condição de permanência ativa da bactéria resistente, com redução mínima de seu metabolismo.

Neste trabalho, observamos 15 isolados MR, ou seja, com resistência à INH, que não apresentaram mutações na segunda região do gene *katG* analisada (*katG2*). Sete destes mostraram mutações na primeira região (*katG1*), a qual pertence o códon 4 (encontrado mutado com grande frequência nesta região do gene em nossos isolados). Portanto, nós sugerimos que o *katG1* deve ser incluído rotineiramente em investigações de resistência à INH, conforme já demonstrado anteriormente por nosso grupo (Siqueira *et al.*, 2009), já que esta região apresenta-se frequentemente alterada em isolados resistentes à INH que não estejam mutados na região *katG2*. Este tipo de análise diminuiria bastante a probabilidade de haver resultados falso negativos para resistência à esta droga, o



que configura-se como um sério problema para o paciente e seu médico com relação a escolha do tratamento a ser seguido, além de poder mascarar o rastreamento para estudos epidemiológicos de cepas que carreguem esta importante resistência.

Existe a possibilidade de que vários isolados MR sajam, na realidade, XDR. São pacientes que tomaram amicacina, ofloxacina, terizidona, etambutol e clofazimina ou pirazinamida (nos primeiros seis meses), por 18 a 24 meses, até serem considerados MR falidos. Como estes doentes pioram rapidamente quando é retirado todo o esquema tuberculostático, eles foram mantidos com terizidona, ofloxacina e etambutol e sob consulta médica periódica. No entanto, seriam necessários testes de sensibilidade para ofloxacina e amicacina para que a distinção entre MR e XDR de nossos isolados ocorresse.

Nós investigamos, neste trabalho, possíveis correlações entre os resultados obtidos através do teste de sensibilidade e sequenciamento com àqueles gerados pelo spoligotyping e *IS6110*-RFLP. Estas associações são extremamente relevantes para o estudo da transmissão global da tuberculose. Um estudo com 99 isolados MR de Portugal, por exemplo, mostrou que o *IS6110*-RFLP em associação com análises de mutações no gene *rpoB* pode ser útil para confirmar identidades de isolados e propor ligações epidemiológicas (Portugal *et al.*, 1999). Em outro trabalho foram analisados 114 isolados de pacientes de uma prisão na Rússia (Toungoussova *et al.*, 2003) e foi determinada a transmissão ativa de cepas MR entre os prisioneiros através da alta taxa de MR e idênticos perfis de RFLP, spoligotypes e mutações no gene *rpoB* entre novos casos. A alta proporção de isolados que formaram grupos genotípicos (79.8%) indica uma transmissão recente e ativa da doença.

Apesar do Brasil possuir uma alta taxa de prevalência da tuberculose, até o momento existem poucos estudos com análises comparativas de mutações nos genes *rpoB* e *katG* com resultados obtidos através de *IS6110*-RFLP e spoligotyping em isolados MR brasileiros. Nós realizamos estas análises em isolados coletados ao longo de um período de 8 anos provenientes de diferentes estados brasileiros. Portanto, nossos achados não só permitem uma melhor compreensão das mutações envolvidas na resistência à RMP e INH entre isolados

MR brasileiros, como podem auxiliar no desenvolvimento ou aprimoramento de testes diagnósticos para tuberculose MR. Além disso, nossos resultados permitem um maior entendimento dos mecanismos de resistência e suas relações com determinadas famílias genotípicas. Nós estabelecemos, por exemplo, o perfil de resistência para as principais famílias encontradas em isolados brasileiros (LAM e T), proporcionando resultados importantes para o controle da MR em nosso país.

## CONCLUSÕES

- a) A família EAI5 do *M. tuberculosis* carrega mutações diferenciadamente no códon 463 do gene *katG*.
- b) A cepa Beijing (extremamente virulenta) esteve circulante no Brasil no período de 1996 a 2003. No entanto, este fato não é alarmante por se tratar de uma ocorrência apenas.
- c) Nós descrevemos quatro novos alelos para o gene *rpoB* (nos códons 471, 475, 539 e 545). Três destes foram encontrados fora da região RRDR (códons 471, 475 e 545). Estes achados irão auxiliar na investigação dos mecanismos de resistência, bem como no desenvolvimento de novos testes diagnósticos.
- d) Além de confirmarmos que a região do gene *katG* contendo o códon 315 é um bom marcador para resistência à INH, nós demonstramos outra região deste gene que possui alta relevância para este tipo de investigação.
- e) Um novo alelo foi descrito para o gene *katG* (deleção no códon 431).
- f) Foram identificadas 5 diferentes famílias (com suas subfamílias) de tuberculose MR circulantes no Brasil, onde as mais frequentemente encontradas foram: LAM (46%), T (17%) e H (12%).
- g) Com relação ao gene *katG*, em localidades onde a família X2 for comum, a primeira região do gene *katG* analisada neste trabalho não deve ser utilizada como marcador para resistência à INH, mas sim a segunda região.
- h) Para a família H, ocorre uma inversão na frequência de ocorrência de mutações no gene *rpoB*, sendo o códon 516 o mais mutado, seguido pelo 526 e 531.
- i) As subfamílias LAM 6 e LAM 9 possuíram mutações na primeira região do gene *katG* (*katG1*) com frequência superior às outras subfamílias, mostrando uma preferência pelas deleções desta região.
- j) A família T demonstrou ter menor diversidade de mutações, tanto para o gene *rpoB* quanto para o gene *katG*, que a família LAM.

- k) A alta taxa de polimorfismo de IS6110-RFLP encontrada entre nossos isolados, indica aquisição independente de resistência entre eles.
- l) Alguns grupos do RFLP agruparam isolados de diferentes estados brasileiros, indicando que houve cepas de livre circulação entre as diferentes regiões do nosso país nos anos analisados.
- m) A ocorrência de 4 isolados da família EAI1 (específica do sudeste da Ásia, Índia e leste da África) indica ter havido transmissão destas cepas entre diferentes continentes.
- n) Cepas MR provenientes do estado de Goiás parecem carregar uma frequência relevante de mutações no códon 65 em *katG1*, fato que não ocorre com as cepas das demais regiões brasileiras.

## REFERÊNCIAS

Abrahão RMCM, Nogueira PA, Malucelli MCI. Tuberculosis in county jail prisoners in the western sector of the city of São Paulo, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;10(2):203-8.

Afanas'ev MV, Ikryannikova LN, Il'ina EN, Sidorenkosv, Kuz'min AV, Larionova EE et al. Molecular characteristics of rifampicina- and isoniazida-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(6):1057-64.

Aslan G, Tezcan S, Serin MS, Emekdas G. Genotypic analysis of isoniazid and rifampin resistance in drug-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in southern Turkey. *Jpn J Infect Dis*. 2008 Jul;61(4):255-60.

Araya, P., Velasco, M., Toqnarelli, J., Arias, F., Leiva, T., Sccapatticio, A., Alviz, P., Fernández, J. 2011. Detection of genes associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Chile. *Rev. Med Chile*. 4, 467-473.

Baptista IMFD, Oelemann MC, Opromolla DVA, suffys PN. Drug resistance and genotypes of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human immunodeficiency-virus infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil. *Men Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(8):1147-52.

Basso LA, Zhang R, Musser JM, Jacobs WR, Blanchard JS. Mechanisms of isoniazida resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymatic Characterization of enoil reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. *J Infect Dis*. 1998;178(3):769-75.

Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth N. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strais. *Trends in Microbiology* 2002;10:45-52.

Braga JU, Werneck Barreto AM, Hijjar MA. Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil 1995-97, IERDTB. Parte III: principais resultados. *Bol Pneumol Sanit* 2003;11:76-81.

Brito RC, Gounder C, Lima DB, Siqueira H, Cavalcanti H R, Pereira MM et al. Resistência aos medicamentos anti-tuberculose de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em hospital geral de referência para tratamento de AIDS no Rio de Janeiro. *J Bras Pneumol*. 2004;30(4):335-42.

Brodin P, Demangel C, Cole ST. Introduction to functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex . In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN Jacobs, Jr W, editors. *Tuberculosis and the tubercle bacillus*. Washington, DC: ASM Press; 2005. p.143-53.

Canetti G, Rist N, Grosset J. Mésure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Méthodologie, critères de résistance, résultats, interprétation. Rev Tuberc Pneumol 1963;27: 217-272.

Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon I, Forestiero F et al. Screening and Characterization of mutations on isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 2004; 48(9):3373-81.

Cain KP, Benoit SR, Winston CA, Mac Kenzie WR. Tuberculosis among foreign-born persons in the United States. JAMA. 2008;300(4):405-12.

Cavalcante SC, Soares EC, Pacheco AG, Chaisson RE, Durovni B. Community DOTS for tuberculosis in a Brazilian favela: comparison with a clinic model. Int J Tuberc Lung Dis. 2007;11(5):544-9.

Cave MD, Murray M, Nardell e. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN Jacobs, Jr W, editors. Tuberculosis and the tubercle bacillus. Washington, DC: ASM Press; 2005. p. 33-46.

Centers For Disease Control and Prevention. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs-worldwide, 2000-2004. MMWR. 2006;55(11):301-5.

Centro de Referência Prof. Helio Fraga. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5.ed – Rio de Janeiro, 2002.

Chan EP, Iseman MD, Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review. Curr Opin Infect Dis. 2008; 21 (6): 587-595.

Chan RC, Hui m, Chan EW, Au TK, Chin ML, Yip CK, Auyeang CK, Yeung CY, Kam KM, Yip PC, Cheng AF. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2007; 59(5):866-73.

Corbett EL, Marston B, Churchyard GJ, De Cock KM. Tuberculosis in sub-Saharan Africa: opportunities, challenges and change in the era of antiretroviral treatment. Lancet. 2006;367(9514):926-37.

Costa ERD, Ribeiro MO, Silva MSN, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, Espinoza RC, Palaci m *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 Microbiology 2009, 9:39.

Costa Neto C. Vila Rosário e a cadeia de Miséria. A caminho da eliminação da tuberculose. *Rev Bras Pneumol Sanit.* 2007;15(1):15-28.

Dalcolmo MP, Fortes A, Fiuza de Melo AF, Motta R, Ide Neto J, Cardoso N. Estudo de efetividade de esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente no Brasil. *J Pneumol* 1999; 25:70-77.

Da Silva PE, Von Groll A, Martin A, Palomino JC. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011. **63**(1):1-9.

Davies PD. The role of DOTS in tuberculosis treatment and control. *Am J Respir Med.* 2003;2(3):203-9.

Dewan P, Sosnovskaja A, Thomsen J, Cicinaite K, Johansen I, Davidaviciene E, Wells C. High prevalence of drug-resistant tuberculosis, Republic of Lithuania 2002;9:170-174.

Diniz LS, Gerhardt G, Miranda JA, Manceau JM. Efetividade do tratamento da tuberculose em oito municípios de capitais brasileiras. *Bol Pneumologia Sanit* 1995;3: 6-18.

Ducati rG, Ruffino-netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption –a review on tuberculosis. *Men Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(7):697-714.

Dye C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet.* 2006; 367(9514):938-40.

Dye C. Doomsday postponed? Preventing and reversing epidemics of drug – resistant tuberculosis. *Nat Rev Micribiol.* 2009; 7 (1): 81-87.

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

Espinal MA, Laserson K, Camaho M, Fusheng Z, Kin SJ, tlali re, Smith I, Suarez P, Antunes ML, George AG, martin-casabona N, Simelane N, Weyer K, Binkin N, Raviglione MC. Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries. *Int j Tuberc Lung Dis* 2001b;5:887-893.

Espinal MA. The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis* 2003; 83:44-51.

Fortes A, Dalcolmo MP. Tuberculose multirresistente. *Pulmão RJ* 1997;6:68-80.

Frieden TR, Sbarbaro JA. Promoting adherence to treatment for tuberculosis: the importance of direct observation. *Bulletin of the World Health Organization.* 2007;85(5):407-9.

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

Gomes C, Rovaris DB, Severino J L, Gruner MF. Perfil de resistência de “*M. tuberculosis*” isolados de pacientes portadores do HIV/AIDS atendidos em um hospital de referência. J. Pneumol 2000;26:25-29.

Gomes, H. M., Elias, A. R., Oelemann, M. A. C., Pereira, M. A. S., Montes, F. F. O., Marsico, A. G., Kritski, A. L., Filho, L. A., Caldas, P. C., Possuelo, L. G., Cafrune, P., Rossetti, M. L., Lucena, N., Saad, M. H. F., Cavalcanti, H. R., Leite, C. Q. F., Brito, R. C., Lopes, M. L., Lima, K., Souza, M., Trindade, R. C., Zozio, T., Sola, C., Rastogi, N., Suffys, P. N. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residentes of 11 states of Brazil. Infection, Genetics and Evolution 2011. 12: 649-656.

Gomgnimbou MK, Abadia E, Zhang J, Refrégier G, Panaiotov S, Bachiyska E and Sola C. “Spoligorifotyping,” a Dual-Priming-Oligonucleotide-Based Direct-Hybridization Assay for Tuberculosis Control with a Multianalyte Microbead-Based Hybridization System. J Clin Microbiol 2012; 50(10):3172-3179.

Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine - a primer. N Engl J Med 2002; 347:1512-1520.

Heym B, saint-joanes B, Cole ST. The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberc Lung Dis. 1999;79(4):267-71.

Höfling CC, Pavan EM, Giampaglia CMS, Ferrazoli L, Aily DCG, Albuquerque DM et al. Prevalence of katG Ser315 substitution and rpoB mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. Int J Tuberc Lung Dis. 2005; 9(1):87-93.

Huang H, Jin Q, Ma Y, Chen X, Zhuang Y. Characterization of *rpoB* mutations in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in China. Tuberculosis 2002;82:79-83.

Jou, R., Chen, H. Y., Chiang, C. Y., Yu, M. C. and Su, I. J. 2005. Genetic diversity of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates and identification of 11 novel *rpoB* alleles in Taiwan. Journal of Clinical Microbiology. 43, 1390-1394.

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Micribiol. 1997; 35 (4): 907-914.

Kim DH, Kim HJ, Park SK, Kong SJ, Kim YS, Kim TH. Treatment outcomes and long-term survival in patients with extensively drug-resistant tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2008; Aug 14.



Kozhamkulov, U., Akhmetova, A., Rakhimova, S., Belova, E., Alenova, A., Bismilda, V., Chingissova, L., ismailov, S., Ramanculov, E., momynaliev, K. 2011. Molecular characterization of rifampicin- and isoniazid- resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Kazakhstan. Jpn J Infect Dis. 3, 253-255.

Kremer K, Glynn JR, Lillebaeck T, Niemann S, Natalia E, Kurepina, Kreiswirth BN. Bifani PJ, van sooling D. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. J Clin Microbiol 2004;42:4040-4049.

Kritski AL, Jesus LSR, Andrade MK, Werneck-barroso E. Retreatment tuberculosis cases: factors associated with drug resistance and adverse outcome. Chest 1997;111:1162-1167.

Kritski AL, Conde MB, Souza GM. Tuberculose do Ambulatório à Enfermaria. Rio de Janeiro: Atheneu, 2<sup>a</sup> ed, 2000.

Kubica T, Rüsche-garder S, Niemann S. The Beijing genotype is emerging among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Germany. Int J Tuberc Lung Dis 2004;8:1107-1113.

Kubica T, Agzamova R, Wright A, Aziz MA, Rakishev G, Bismilda V. The Beijing genotype is a major cause of drug-resistant tuberculosis in Kazakhstan. Int j Tuberc Lung Dis. 2005;9(6):646-53.

Lauzardo M, Ashkin D. Phthisiology at the dawn of the new century. Chest 2000;117: 1455-1473.

Lipin MY, Stepanshina VN, Shemyakin IG and Shinnick TM. Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. Clin Microbiol Infect 2007. 13: 620–626.

Loddenkemper R, Sagebiel D, Brendel A. Strategies against multidrug-resistant tuberculosis. Eur Respir J. 2002; 20(Suppl.36)66s-77s.

Mani N, Selvakumar N, Narayanan S, Narayanan PR. Mutation in *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India. J Clin Microbiol. 2001;39(8):2987-90.

MD.Saúde:Tuberculose Sintomas e tratamento. [internet] 2012 [acesso em 2012 mar 13]; Disponível em: <http://www.mdsaude.com/2009/04/sintomas-de-tuberculose.html#ixzz1p1isWP26>

Mendes JM, Lourenço MC, Ferreira RMC, Fonseca LS, Saad MHF. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from sputum samples from symptomatic outpatients – Complexo de Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. J Bras Pneumol. 2007;33(5):579-82.

Menzies D, Fanning A, Yuan L, Fitzgerald M. Tuberculosis among health care works. *N E J Med* 1995; 332:92-100.

Miller LP, Crawford JT, Shinnick TM. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:805-811.

Ministério da Saúde (MS)/FUNASA, Centro de Referência Prof. Helio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose, 1994.

Ministério da Saúde (MS). Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. Revisão da definição nacional de casos de Aids em indivíduos com 13 anos ou mais. Brasília, 1998.

Mitnick CD, Shin SS, Seung KJ, Rich ML, Atwood SS, Furin JJ et al. Comprehensive treatment of extensive drug-resistant tuberculosis. *N Engl J Med*. 2008;359(6):563-8.

Müller B, Borrell S, Rose G, Gagneux S. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Genet*. 2013; 29(3):160-9.

Oliveira MM, Rocha AS, Oelemann MC, Gomes HM, Fonseca L, Werneck-barroso AM, Valim AM, Rossetti ML, Rossau R, Mijs W, Vanderborght B, Suffys P. Rapid detection of resistance against rifampicin in isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Brazilian patients using a reverse-phase hybridization assay. *J Microbiol Methods* 2003; 53:335-342.

Perizzolo, P. F., costa, E. R. D., ribeiro, A. W., spies, F. S., ribeiro, M. O., dias, C. F., unis, G., silva, P. A., gomes, H. M., suffys, P. N., rossetti, M. L. R. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Southern Brazil. *Tuberculosis* 2012. 92: 56-59.

Petrini B, Hoffner S. Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. *Int J Antimicrob Agents*. 1999;13(2):93-7.

Picon PD, della giustina M, Jaczewski CA, Veronesi CSP, Rizzon CFC, Gutierrez R S. Tratamento da tuberculose com o esquema RHZ. *J. Pneumol* 2000; 26:S19-S19.

Portugal I, Maia S and Moniz-pereira J. Discrimination of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 Fingerprint Subclusters by *rpoB* Gene Mutation Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 1999. 37(9):3022–3024.

Poudel A, Nakajima C, Fukushima Y, Suzuki H, Pandey BD, Maharjan B, Suzuki Y. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolated in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 06: 481-11.

Pratt R, Navin T, Menzies H. Trends in tuberculosis – United States, 2007. *MMWR* 2008;57(1):281-5.

Pyn AS, Saint-joanis B, Cole ST. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission. *Infection and Immunity* 2002;70(9):4955-60.

Rajbhandary SS, Marks SM, Bock NN. Costs of patients hospitalized for multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:1012-1016.

Ramaswami S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Update. *Tuberc Lung Dis*. 1998;79(1):3-29.

Raviglione MC. Facing extensively drug-resistant tuberculosis – a hope and a challenge. *N Engl J Med*. 2008;359(6):636-8.

Rosemberg J. Tuberculose – aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. *Bol Pneumologia Sanit* 1999; 7: 5-29.

Rouse DA, Devito JA, Li Z, Byer H, Morris SL. Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis* effects on catalase-peroxidase activities and isoniazida resistance. *Molecular Microbiology*. 1996;22(3):583-92.

Ruffino Netto A. Brasil e a tuberculose – doença emergente ou reemergente? *Bol Pneumologia Sanit* 1997; 5:3-4.

Ruffino NETto A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. *Rev Soc Bras Méd Trop*. 2002;35(1):51-8.

Sajduda A, Brzostek A, Popawska M, Rastogi N, Sola C, Augustynowicz-kopec, Zwolska Z, Dziadek J, Portaelss F. Molecular epidemiology of drug-resistance *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients with pulmonary tuberculosis in Poland: a 1-year study. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:1448-1457.

Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Megan BM. Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database 2009. *PLoS Med* 6(2): e1000002. doi:10.1371/journal.pmed.1000002.

Santos, L. C., Bousquet, H. M., Pereira, A. M., Junqueira-kipnis, A. P., Kipnis, A., 2010. A high prevalence of resistance in new tuberculosis cases of Midwestern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*. 10: 1052-1057.

Schluger NW, Rom W N. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157: 679-691.

SESMG. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. [internet] 2006 [acesso em 2012 abr 3]; Disponível em: [www.scribd.com/doc/39030621/6/A-POPULACAO-DE-RISCO](http://www.scribd.com/doc/39030621/6/A-POPULACAO-DE-RISCO)

Shemyakin G, Stepanshina VN, Ivanov IY, Lipin MY, Anisimova VA, Onasenko AG, Korobova OV, Shinnick TM. Characterization of drug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* derived from Russian inmates. *Int J Lung Dis* 2004;8:1194-1203.

Silva A E P & Palomino J C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother* 2011;doi:10.1093/jac/dkr173.

Silva Pea, Osorio M, Reinhardt MC, Fonseca LS, Dellagostin OA. Drug resistance of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Brazil. *Microbes and Infec* 2001;3:1111-1113.

Silva MSNS, Senna SG, Ribeiro MO, Valim ARM, Telles MA, Kritski A et al. Mutations in *katG*, *inhA* and *ahpC* genes of brasilian isoniazida-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4471-4.

Silveira, IC. O Pulmão na Prática médica. Sintoma, diagnóstico e tratamento. EPUB 2000; 1: 331-354.

Singh JA, Upshur R, Padayatchi N. XDR-TB in South Africa: no time for denial or complacency. *PLoS Medicine*. 2007;4(1):19-25.

Siqueira HR, Lima DB, Jansen JM, Paiva DD, Lopes AJ, Capone D et al. Tuberculose. In Jansen JM, Lima DB, Lopes AJ, Capone D, Maeda TY, Noronha A et al. *Pneumo-AIDS – Clínica, Radiologia, Patologia*. Revinter Ltda. Rio de Janeiro, 2005. p 73-106.

Siqueira HR, Freitas FAD, Oliveira DN, Barreto AMW, Dalcolmo MP, Albano RM. Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains arising from mutations in two different regions of the *katG* gene. *J Bras Pneumol* 2009; 35(8):773-779.

Siu GK, Tam YH, Ho PL, Lee AS, Que TL, Tse CW, Yip KT, Lam JT, Cheng VC, Yuen KY, Yam WC. Direct detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011. 69: 51-58.

Slayden RA, Barry C 3 RD. The genetic and biochemistry of isoniazida resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection*. 2000;2(6):659-69.

Slayden ra, Lee RE, Barry CE. Isoniazid affects multiple components of the type II fatty acid synthase system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*. 2000;38(3):514-25.

Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Resp Res* 2001;2:164-168.

Subramani R, Radhakrishna S, Frieden TR, Kolappan C, Gopi PG, Santha T. Reapid decline in prevalence of pulmonary tuberculosis after DOTS implementation in a rural area of South India. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008;12(8):916-20.

Teixeira GM. XDR-TB – uma grave e emergente ameaça à saúde pública. *Rev Bras Pneumol Sanit*. 2007;15(1) :3-6.

Telenti A. Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax*. 1998; 53(9):793-7.

Telenti A., Honoré N., Bernascone C., March J., Ortega A., Heym B., Takiff H. E., Cole S. T., 1997. Genotypic Assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. *J Clin Microbiol.*; 719-723.

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

Telles MA, Ferrazoli L, Waldman EA et al. A population-based study of drug resistance and transmission of tuberculosis in an urban community. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9(9):970-6.

Timperi R, Han LL, Slotsky A, Becerra MC, Nardell EA, Salazar JJ, Smith-fawzi MC. Drug resistance profiles of *Mycobacterium tuberculosis* isolates: five years experience and insight into treatment strategies for MDR-TB in Lima Peru. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9:175-180.

Toledo AS, Costa MJM, Souza MM, Cordeiro J, Ribeiro J, Biondi E. Tuberculose resistente aos tuberculostáticos em população carcerária –Rio de Janeiro/RJ. *J Pneumol* 2000;26:S94-S94.

Toungoussova OS, Sandver P, Mariandyshev AO, Nizovtseva NI, Caugant DA, Bjune G. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing Genotype in the Archangel Oblast Rússia. *J Clin Microbiol*. 2002;40 (6):1930-7.

Toungoussova OS, Mariandyshev A, Bjune G, Sandven P and Caugant DA. Molecular Epidemiology and Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in the Archangel Prison in Russia: Predominance of the W-Beijing Clone Family. *Clinical Infectious Diseases* 2003. 37:665–72.

Tracevska T, Jansone I, Baumanis V, Marga O, Lillebaek T. Prevalence of Beijing genotype in Latvian multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7:1097-1103.

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

Valvatne H, Syre H, Kross M, Stavrum R, Ti T, Phyu S and Grewal H. Isoniazid and rifampicin resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Yangon, Myanmar: implications for rapid molecular testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; 64: 694-701.

Van Embden ID, Cave MD, Crawford JT . Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin. Microbiol.* 1993; 31:406-409.

Whelen AC, Felmle Ta, Hun JM. Direct genotypic detection of *M. tuberculosis* rifampin resistance in clinical specimens by using single-tube heminested PCR. *J Clin Microbiol* 1995;3:556-561.

Williams D, Waguespack C, Eisenach K. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:(10)2380-6.

World Health Organization (WHO) Global Tuberculosis Control: epidemiology, strategy, financing WHO report 2011. Geneve (WHO/CDS/TB2003.331.)

WHO. Banco Mundial da saúde. Relatório Mundia da Saúde. [internet] 2009. [acesso em 2012 abr 22]; Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563802\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563802_eng.pdf)

WHO. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. [internet] 2010. [acesso em 2012 mar 13]; Disponível em : [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_de\\_recomendacoes\\_controle\\_tb](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_tb)

World Health Organization (WHO, 2006a). Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. WHO REPORT. Geneva. 2006.

World Health Organization (WHO, 2006b). Report of the meeting of the WHO Global Task Force on XDR-TB. Geneve, Switzerland, 9-10 October 2006. [internet] [acesso em 2011 out 1]; Disponível em: [http://www.who.int/entity/tb/challenges/xdr/news\\_oct06.pdf](http://www.who.int/entity/tb/challenges/xdr/news_oct06.pdf)

World Health Organization. The global task force on XDR-TB. Stop TB Department. [internet] 2007 [acesso em 2011 out 1]. 01/10/2011. Disponível em: [http://www.who.int/tb/features\\_archive/strengthening\\_xdr\\_global\\_response/en/](http://www.who.int/tb/features_archive/strengthening_xdr_global_response/en/)

World Health Organization (WHO 2008a). Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Fourth Global Report. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. [internet] 2008. [acesso em 2011 out 1]. Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/2008/drs\\_report4\\_26feb08.pdf](http://www.who.int/tb/publications/2008/drs_report4_26feb08.pdf)

World Health Organization (WHO 2008b). Frequently asked questions – XDR-BR. [internet] 2008 [acesso em 2008 out 7]. 01/10/2008. Disponível em: <http://www.who.int/tb/challenges/xdr/faqs/en/>

World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO Report; [internet] 2012. [acesso em 2011 out 7] ; Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf). Geneva, World Health Organization.

Yang Z; Durmaz R; Yang D; Gunal S; Zhang L; Foxman B; Sanic A; Marrs C F. Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 53 (2005) 201–208.

Yoshicai Y. Immunological protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. Crit Rev Immunol. 2006;26(6):515-26.

Yue, J., Shi, W., Xie, J., Li, Y., Zeng, E. and Wang, H. 2003. Mutations in *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. J. Clin. Microbiol. 41: 2209-2212.

Zager EM, Mcnerney R. Multidrug-resistant tuberculosis. BMC Infectious Diseases [internet] 2008. [acesso em 2011 out 7]; Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/8/10>

Zhang Y, Vilchèze C, Jacobs JR WR. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs Jr W, editors. Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. Washington, DC: ASM Press; 2005. p. 115-40.

Zumia A, Grange JM. Multidrug-resistance tuberculosis – can the tide be turned? Lancet Infect Dis 2001;1:199-202.

Zhang Y, Telenti A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Hatfull GF, Jacobs Jr WR, editors. Molecular Genetics of Mycobacteria. Washington, DC: ASM Press; 2000. p. 235 – 254.

**APÊNDICE – Artigo submetido ao “Journal of Antimicrobial Chemotherapy” em 13 de setembro de 2013**

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

**Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: katG and rpoB mutation profiles and genotypic correlations in strains from Brazil**

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Journal:                      | Journal of Antimicrobial Chemotherapy   |
| Manuscript ID:                | JAC-2013-1362   |
| Manuscript Type:              | Original Article  |
| Date Submitted by the Author: | 13-Sep-2013   |
| Complete List of Authors:     | Freitas, Flávia; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes<br>Bernardo, Vagner; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Bioquímica<br>Gomgnimbou, Michel; CNRS-Université Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie- Infection Genetics Emerging Pathogens Evolution Team<br>Sola, Christophe; CNRS-Université Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie- Infection Genetics Emerging Pathogens Evolution Team<br>Siqueira, Helio; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas<br>Pereira, Marcia; Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Referência Professor Heitor Fraga<br>Fandinho, Fátima; Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Referência Professor Heitor Fraga<br>Gomes, Harrison; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Mycobacteria<br>Araújo, Marcelo; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Mycobacteria<br>Suffys, Philip; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Mycobacteria<br>Marques, Elizabeth; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas<br>Albano, Rodolpho; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes |
| Keywords:                     | Multidrug resistance, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , Molecular epidemiology  |

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Journal of Antimicrobial Chemotherapy: under review



**Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: katG and rpoB  
mutation profiles and genotypic correlations in strains from  
Brazil**

Flávia A. D. de Freitas<sup>1</sup>, Vagner Bernardo<sup>1</sup>, Michel K. Gomgnimbou<sup>2</sup>, Christophe Sola<sup>2</sup>,  
Hélio R. Siqueira<sup>3</sup>, Márcia A. S. Pereira<sup>4</sup>, Fátima C. O. Fandinho<sup>4</sup>, Harrison M. Gomes<sup>5</sup>,  
Marcelo E. I. Araújo<sup>5</sup>, Philip N. Suttys<sup>5</sup>, Elizabeth A. Marques<sup>3</sup>, Rodolpho M. Albano<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup> CNRS–Université Paris–Sud, Institut de Génétique et Microbiologie– Infection Genetics Emerging Pathogens Evolution Team, Orsay, France

<sup>3</sup> Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>4</sup> Centro de Referência Professor Hélio Fraga, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>5</sup> Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Mycobactéria, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

\* Corresponding author:

Rodolpho M. Albano

Departamento de Bioquímica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Blv. Vinte e Oito de Setembro, 87, fundos, 4 andar

Rio de Janeiro, RJ 20551-030, Brazil

Email: [albano@uerj.br](mailto:albano@uerj.br)

Phone: 55-21-2868-8465

Running title: Molecular epidemiology of *M. tuberculosis* isolates from Brazil

36 **Abstract**

37

38 **Objectives:** Multidrug resistance (MDR) is a critical factor in tuberculosis (TB)  
39 control. Though a high TB and HIV burden country, few studies have described  
40 the molecular epidemiology of MDR *Mycobacterium tuberculosis* strains in  
41 Brazil. Here we investigate the genotypic diversity of MDR *M. tuberculosis*  
42 isolates from a national MDR TB reference center and screen for MDR  
43 associated gene mutations.

44 **Methods:** Ninety-nine MDR isolates from 12 Brazilian states were studied. Drug  
45 resistance patterns were determined and the *rpoB* and *KatG* genes, associated  
46 with rifampin and isoniazid resistance, were screened for mutations. Genotypic  
47 diversity was investigated by *IS6110*-RFLP and Luminex® spoligotyping.

48 **Results:** *rpoB* and *KatG* mutations were seen in 90.9% and 93% of the  
49 isolates, respectively. Codon 315 *KatG* mutations occurred in 82.8% of the  
50 isolates with a predominance of the Ser315Thr substitution. Twenty-five isolates  
51 were clustered in 11 groups with identical *IS6110*-RFLP patterns while 74  
52 isolates showed unique patterns with no association between mutation  
53 frequencies or susceptibility profiles. The most prevalent spoligotyping lineages  
54 were LAM (46.5%), T (17.2%) and Haarlem (12.1%). The Haarlem lineage  
55 showed an atypical behavior with a higher frequency of codon 516 *rpoB*  
56 mutations while in the other isolates codon 531 mutations prevailed.

57 **Conclusions:** Our data suggest that there were no major MDR isolates  
58 transmitted among patients in Brazil, indicating an independent acquisition of  
59 resistance. In addition, drug resistance associated mutation profiles were well  
60 established among the main spoligotyping lineages found in Brazilian isolates,  
61 providing useful data for patient management and treatment in this country.

62

63

64

65

66

67

## 68 Introduction

69 Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by bacteria of the  
70 *Mycobacterium tuberculosis* complex. In general, its clinical form is  
71 characterized by lung impairment, however, this disease may also affect other  
72 anatomical sites or occur in a disseminated form. TB is currently one of the  
73 main causes of morbidity and mortality affecting the main vulnerable groups  
74 (young adults, children and people with HIV).<sup>1</sup>

75 According to the World Health Organization (WHO), in 2011 there were  
76 an estimated 8.7 million new TB cases in the world (13% co-infected with HIV)  
77 representing a burden of 1.4 million deaths. Brazil is one of the 22 countries  
78 which account for 82% of all TB cases in the world.<sup>1</sup> As such, TB is a highly  
79 relevant public health issue in Brazil, being the third cause of death from  
80 infectious diseases, ranking first among AIDS patients. In 2011, there were  
81 69,245 new TB cases in Brazil with an incidence of 36/100,000 inhabitants and  
82 a mortality rate of 2.4/100,000. The Brazilian states accounting for 55% of all TB  
83 cases were Bahia, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul and São  
84 Paulo.<sup>1</sup>

85 The high TB prevalence is assumed to result from poverty, the HIV  
86 epidemic and inadequate diagnosis and treatment.<sup>2,3</sup> Isoniazid (INH) and  
87 rifampin (RMP) are still the most important drugs available for TB treatment,  
88 even though they were introduced more than 40 years ago. Multidrug resistance  
89 (MDR), defined as resistance to at least RMP and INH, is another critical factor  
90 involved in TB control as MDR *M. tuberculosis* strains are highly pathogenic and  
91 have the potential for great dissemination. The standard treatment requires six  
92 months of chemotherapy while the regimen for most MDR-TB patients takes 20

93 months. Treatment of MDR-TB is carried out with second line drugs that are  
94 costly, more toxic, have lower efficacy and can generate serious side-effects.<sup>1,4</sup>  
95 MDR-TB is also a great concern in the antibiotic resistance pandemic due to the  
96 high risk of death and because patients can remain infected for long periods of  
97 time, even for years.<sup>5,6,7</sup> Worldwide, 3.7% of new and 20% of previously treated  
98 TB cases are estimated to be MDR, comprising approximately 630,000  
99 individuals.<sup>1</sup>

100 Gene mutations are typically responsible for resistance to specific drugs  
101 in *M. tuberculosis*. Since its discovery, more than 35 years ago, RMP has been  
102 the most important drug available for TB treatment. It inhibits gene transcription  
103 by binding to the beta subunit of the DNA dependent RNA polymerase,  
104 encoded by the *rpoB* gene. Most *rpoB* mutations occur in a 81 bp region known  
105 as RRDR (rifampicin resistance determining region), located between codons  
106 507 and 533.<sup>8</sup> In the strains bearing these mutations drug binding is altered,  
107 allowing gene transcription to continue.<sup>9</sup>

108 Several genes can be involved in INH resistance (*katG*, *inhA*, *KasA*, *ndh*,  
109 the *oxyR-ahpC* intergenic region, *fabG*, *fadE24*, *inhA* promoter, *iniA* and the  
110 *mabA-inhA* operon).<sup>10,11</sup> The *katG* gene encodes the catalase-peroxidase  
111 enzyme, that is involved in the activation of the pro-drug INH into its active form,  
112 generating in the process oxygen-derived free radicals (superoxide, hydrogen  
113 peroxide and peroxynitrate) and organic free radicals that inhibit the formation  
114 of mycolic acids and cause DNA damage. The loss or reduction of catalase-  
115 peroxidase activity by mutations prevents this process, allowing survival in the  
116 presence of INH.<sup>12,13</sup> *KatG* gene mutations are present in most INH resistant *M.*  
117 *tuberculosis* clinical isolates where alterations in codon 315 predominate.<sup>14,15</sup>

118 Mutations located at the 15<sup>th</sup> nucleotide preceding the *mabA-inhA* operon  
119 lead to INH resistance due to a titration mechanism that generates  
120 overproduction of the drug target, accounting for 8-30% of the resistant  
121 strains.<sup>11</sup> Mutations in the other genes are rare and usually coexist with other  
122 hotspot mutations in *KatG* and *mabA-inhA*.<sup>11</sup>

123 Molecular techniques that differentiate *M. tuberculosis* strains are  
124 important tools in public health issues such as TB outbreaks and to unravel  
125 transmission patterns. Transposable elements and other repetitive DNA  
126 elements in *M. tuberculosis* complex strains are at the base of frequently used  
127 typing techniques in this organism. The RFLP (restriction fragment length  
128 polymorphism) analysis of the IS6110 insertion element (IS6110-RFLP), when  
129 performed under standardized conditions, is highly reproducible and effective in  
130 transmission studies in a specific region or place or between populations, as  
131 individual lineages can be tracked and identified, providing better ways to  
132 understand and control disease transmission.<sup>15,17</sup>

133 The basis for spoligotyping (spacer oligonucleotide typing) lies in the  
134 direct repeat region present in the *M. tuberculosis* genome that consists of a  
135 well-conserved direct 36 bp sequence repeated 10 to 50 times interspersed with  
136 unique spacer sequences. In this technique, the number of direct repeats is  
137 determined by PCR and reverse hybridization on a commercially available  
138 membrane.<sup>18</sup> In general, spoligotyping has less discriminatory power than  
139 IS6110-RFLP, however, it is a fast and highly reproducible genotyping method.  
140 Alone or in conjunction with other techniques, spoligotyping can be used to  
141 establish strain/isolate relationships, investigate circulating strains, transmission  
142 dynamics and the natural history of TB.<sup>19,20,21,22,23</sup>

143 Here we present the mutation profiles of the *KatG* and *rpoB* genes and  
144 the genotypic diversity by IS6110-RFLP and spoligotyping of 99 MDR *M.*  
145 *tuberculosis* isolates obtained at a MDR-TB national reference center located in  
146 Rio de Janeiro. Until now, few studies have described the molecular  
147 epidemiology of MDR strains in Brazil so our objective was to investigate  
148 correlations between genotypes and *KatG* and *rpoB* mutations and evaluate  
149 relationships within these isolates and with the main global circulating *M.*  
150 *tuberculosis* strains. This information could be useful for TB care and control as  
151 Brazil has a considerable incidence of primary resistance which is typically 6%  
152 and 1.5% for INH and RMP, respectively.<sup>24</sup>

153

#### 154 **Materials and methods**

155

##### 156 ***Mycobacterium tuberculosis* Isolates**

157 Ninety-nine MDR *M. tuberculosis* isolates were provided by the National  
158 TB Reference Center for Multidrug Resistance Prof. Helió Fraga, in Rio de  
159 Janeiro, Brazil. According to international standards MDR is defined as  
160 resistance to at least INH and RMP. These *M. tuberculosis* isolates were  
161 obtained from patients with pulmonary TB who were referred to the Center  
162 between 1995 and 2003. Fifty three isolates were from patients that resided in  
163 Rio de Janeiro State and 46 isolates were from patients living in 12 other  
164 Brazilian States (Amazonas: 3; Pará: 5; Maranhão: 4; Ceará: 2; Paraíba: 3;  
165 Pernambuco: 5; Bahia: 2; Goiás: 3; Minas Gerais: 4; São Paulo: 6; Paraná: 7  
166 and Rio Grande do Sul: 2) (Figure S1). Isolation was achieved from sputum  
167 samples by cultivation in Löwenstein-Jensen (LJ) medium.

168

169 **Drug susceptibility tests**

170 Drug resistance patterns were determined on LJ medium using the  
171 proportions method at critical concentrations and critical proportions of the  
172 population indicating bacterial resistance. The concentrations and proportions  
173 were 40 mg/L and 1.0% for RMP, 0.2 mg/L and 1.0% for INH, 100 mg/L and  
174 10% for pirazinamid (PZA), 4 mg/L and 10% for streptomycin (St) and 2.0 mg/L  
175 and 1.0% for ethambutol (EMB).<sup>25</sup>

176

177 **DNA extraction**

178 *M. tuberculosis* isolates were cultured for three to four weeks at 37 °C in  
179 LJ medium. Genomic DNA was prepared as described by van Soolingen *et al*  
180 (1991).<sup>26</sup> Briefly, 100 mg of cultured cells was transferred to a microcentrifuge  
181 tube containing 400 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) and  
182 heated at 80 °C for 20 min to kill the cells. Lysozyme to a final concentration of  
183 10 mg/ml was added and the tubes were incubated at 37 °C overnight. A volume  
184 of 70 µl of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 6 µl of proteinase K (10  
185 mg/ml) was added and the mixture was incubated for 10 min at 65 °C. One-  
186 hundred microliters of NaCl 5M and 100 µl of 10% CTAB (N-cetyl-N,N,N-  
187 trimethyl ammonium bromide) containing 4% NaCl were added and the samples  
188 were briefly mixed in a vortex and incubated for 10 min at 65 °C. The mixture  
189 was extracted with an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol, centrifuged  
190 for 10 min at top speed in a microcentrifuge and 0.6 volumes of isopropanol  
191 were added to the supernatant to precipitate the DNA. After 30 min at -20 °C the  
192 samples were centrifuged for 15 min and the pellet was washed once with 70%



193 ethanol and air-dried. The pellet was finally dissolved in TE buffer and the  
194 resulting genomic DNA was inspected by agarose gel electrophoresis and  
195 quantified on a spectrophotometer (Nanoview, GE Healthcare, Brazil).

#### 197 **Genotyping by IS6110-RFLP**

198 DNA fingerprinting using IS6110 RFLP was performed on the isolates  
199 following standard procedures.<sup>27</sup> Briefly, extracted mycobacterial DNA was  
200 digested with *PvuII*, separated by electrophoresis, transferred to a Hybond N<sup>+</sup>  
201 membrane and hybridized with a horseradish peroxidase conjugated 245-bp  
202 PCR-amplified probe directed against the right arm of IS6110. Detection was  
203 performed with the ECL Direct Labeling and Detection System (GE Healthcare  
204 Life Sciences, Brazil). Autoradiograms were scanned at 190 dots/inch and  
205 IS6110 patterns were analyzed using Bionumerics (Windows version 4.0,  
206 Applied Maths). The position of IS6110 containing fragments was normalized  
207 against the internal markers and the accuracy of the procedure was verified by  
208 comparison of IS6110 banding patterns to those of strain Mt.14323 on different  
209 autoradiograms. Similarity matrices were constructed using the Dice band-  
210 based similarity coefficient using a band tolerance interval of 2.0% of the pattern  
211 length and dendrograms were generated by the hierarchic unweighted pair  
212 group method analysis (UPGMA) clustering algorithm.

#### 214 **Genotyping by Luminex® spoligotyping**

215 Spoligotyping was performed as described previously.<sup>28</sup> We used the  
216 Luminex 200® platform and spoligotype patterns were entered in the SITVIT2  
217 proprietary database of the Institut Pasteur de la Guadeloupe, which is an



218 updated version of the previously released SpoIDB4 database (available online  
219 <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo>).<sup>29</sup>

220 A sample is classified as new when it does not show the Spoligotype  
221 International Type (SIT) that designates patterns shared by two or more patient  
222 isolates. Therefore, a new spoligotype pattern is one that has never been  
223 reported before. However, the isolates classified as unknown do have an SIT  
224 number but the lineage to which they belong is unknown.

225

#### 226 ***KatG* and *rpoB* mutation analysis**

227 Mutation analysis of the *KatG* gene (GenBank accession number  
228 U06258) was concentrated on two regions of interest. The first extends from the  
229 first codon (GTG/valine) to codon 119 and it was PCR amplified using primers  
230 *KatG1* sense, 5'-A CTTCGCGATCACATCCGTG-3' and *KatG1* antisense, 5'-  
231 GCGGCCGTCGTGGATGCGGTA-3'. The second region, from codon 267 to  
232 504, was amplified with primers *KatG2* sense, 5'-  
233 CGGCGGTCACACTTTCGGTA-3' and *KatG2* antisense 5'-  
234 CCCGACTTGTGGCTGCAGGC-3'. The region comprehending codons 445 to  
235 560 of the *rpoB* gene (GenBank accession number L27989) was PCR amplified  
236 with primers *rpoB* sense 5'-CATCGACCACTTCGGCAACCG-3' and *rpoB*  
237 antisense 5'-TTTCGATCGGGCACATCCGGC-3'. All PCR reactions were  
238 performed using Platinum *Taq* (Invitrogen, Brazil), 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 15 pmol of  
239 each primer, 0.2 mM of dNTPs, 1X PCR buffer (provided by the manufacturer)  
240 and 40 ng of genomic DNA. PCR parameters were as follows: denaturation at  
241 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95°C for 45 s, 56°C (for *rpoB*) and 63°C  
242 (for *KatG*) for 45 s and 72°C for 1 min, and a final extension time of 10 min at

243 72°C. Amplicons were analyzed by agarose gel electrophoresis, purified by the  
244 Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Brazil),  
245 sequenced directly with the DYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (GE  
246 Healthcare) and analyzed on a MegaBACE 1000 automated DNA sequencer  
247 platform (GE Healthcare). Several reactions in both directions were done for  
248 each amplicon to ensure accurate sequencing. Chromatograms were analyzed  
249 using Chromas software (version 2.22, Technelysium Pty, Ltd, Towantin, QLD,  
250 Australia). The consensus sequences of each sample were compared to the  
251 wild-type *M. tuberculosis* *KatG* and *rpoB* gene sequences in order to identify the  
252 mutations. Blast searches against Genbank were performed for nucleotide  
253 comparisons.

#### 255 **MabA-15 MAS-PCR**

256 MabA-15 MAS-PCR was carried out as described previously.<sup>11</sup>

#### 258 **Statistical analysis**

259 Data was analyzed with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad  
260 Software Inc. La Jolla, CA, USA). Associations between categorical variables  
261 were assessed using the Chi-squared test or Fisher's exact test. A *P* value of  
262 <0.05 was considered statistically significant.

#### 264 **Results and Discussion**

265 All of the 99 MDR isolates analyzed were resistant to INH and RMP  
266 while 52 were resistant to EMB and 35 to streptomycin ST (Table 1). Drug  
267 susceptibility results for some of the isolates could not be determined due to

intrinsic difficulties of the method. Susceptibility patterns for all samples are shown in Table S1.

Ninety (90,9%) isolates had mutations in the 81-bp RRDR region of the *rpoB* gene. A total of 51 (51.5%), 23 (23.3%) and 11 (11.1%) isolates carried mutations at codons 531, 526 and 516, respectively, confirming this segment of the gene as a hotspot region, as observed worldwide.<sup>15,30-37</sup> The other five isolates had mutations distributed among other codons (Table 2). Furthermore, eight isolates that had mutations in codon 531, 526 or 516, also had mutations in other codons. Therefore, 82 isolates exhibited single changes but seven presented double mutations, always in conjunction with the altered codons 531, 526 or 516. One isolate had point mutations in three separate codons (531, 522 and 539). I

We found four new alleles for the *rpoB* gene in codons 475, 539, 545 and 471. Three of them occurred as double mutations involving always one of the most frequently mutated codons. Three of these alleles were from isolates from Rio de Janeiro state while the one in codon 471 was from a Pernambuco isolate.

We previously reported *KatG* mutation profiles for 64 of the isolates included in this study<sup>38</sup> and now the remaining 35 samples are analyzed. Two regions of this gene were sequenced, *KatG1* and *KatG2*, the latter containing codon 315, the most commonly mutated one.<sup>15,30,31,39-42</sup> *KatG* mutations were found in 92 (93%) isolates and seven of them had mutations only in the *KatG1* region. Among these 92 isolates, 82 had changes in codon 315 and 5 showed double mutations in the *KatG2* region in codons 463, 399, 493 or 485 that were always accompanied by codon 315 alterations (Table 2). Although amino acid

changes in codon 431 have already been described<sup>43</sup>, we also found a new single nucleotide (G) deletion in this codon. Thirty (30.3%) isolates had mutations within *KatG1*, 26 of them being deletions in codon 4. The remaining 4 isolates showed insertions, deletions and base substitutions in *KatG1* (Table 2). The full results of the mutation screening of the *rpoB* and *KatG* genes can be seen in Table S2.

Three MDR isolates had no *KatG* and *rpoB* mutations and 6 others were RMP resistant but also had no *rpoB* mutations. Curiously, although most samples in this study were from Rio de Janeiro state, only one of these 6 isolates was from this state. Additionally, 4 other isolates were INH resistant but had no *KatG* mutations. It is possible that some of these isolates possess an efflux mechanism of drug resistance, extruding structurally and functionally unrelated compounds by transporter pumps. This mechanism can be responsible for intrinsic and acquired drug resistance in prokaryotic and eukaryotic cells.<sup>44</sup> Moreover, especially regarding resistance to INH, mutations in other genes can be involved. We also investigated through multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR), mutations in the *mabA-15* region in the 8 INH resistant isolates that carried the wild type *KatG* gene and found that only one had a mutation in this region (data not shown).

This investigation not only confirms data observed in other studies analyzing the resistance and mutation profiles of Brazilian MDR isolates but also describes new mutations in isolates that were collected over an eight-year period from different Brazilian states. Furthermore, the mutation profiles described in our data can help in the design of rapid diagnostic tests that

317 simultaneously detect TB and MDR by new strategies such as high resolution  
318 melting analysis in qPCR.

319 To evaluate whether SNP frequencies could be influenced by clustered  
320 isolates, possible genetic relationships between these isolates were  
321 investigated through IS6110 – RFLP. The number of IS6110 copies observed  
322 ranged from 2 to 18 with an average number of 10. Twenty-five isolates were  
323 clustered in 11 groups comprising 2 or 3 isolates with identical RFLP patterns  
324 (Table 3). The remaining 74 isolates showed unique IS6110 patterns and there  
325 was no association between mutation frequencies at each mutated codon or  
326 susceptibility profiles.

327 Two RFLP clusters (cluster 4 and cluster 5) with 2 isolates each showed  
328 similar resistance profiles and carried single *rpoB* and *KatG* mutations at codon  
329 531 and 315, respectively. However, in cluster 5, the resistance profile was  
330 different for each isolate concerning EMB and ST. The transmission of the  
331 same MDR isolate between the patients of these 2 clusters may have  
332 happened, as suggested by the fact that all isolates in these clusters came from  
333 Rio de Janeiro state and showed similar drug resistance patterns and identical  
334 *rpoB* and *KatG* mutations.

335 Regarding the other nine clusters, no apparent mutation or resistance  
336 profile relationships were detected. Their *rpoB* and *KatG* mutations were  
337 somewhat different with some showing distinct amino acid changes (clusters 6  
338 and 7) or different mutations at the same gene (*rpoB* mutations in clusters 1, 3,  
339 6, 8, 9, 10). Interestingly, in several clusters a *KatG* codon 4 deletion was found  
340 in one of the isolates belonging to the same cluster (clusters 1, 2, 6, 7, 8, 10,  
341 11) (Table 3). This indicates that transmission of the same isolate happened

342 before the MDR phenotype was established, suggesting an independent  
343 acquisition of antibiotic resistance. Moreover, clusters 1, 3, 7 and 9 exhibited  
344 isolates that were from different states, indicating that the same strain may have  
345 circulated freely between different Brazilian regions. Seven clusters showed  
346 different mutation profiles for the *rpoB* or *KatG* gene. These data suggest that  
347 there were no major MDR strains transmitted between patients in Brazil  
348 between the years 1995 and 2003.

349 We observed a high rate of *IS6110*-RFLP polymorphisms among the 99  
350 MDR isolates, indicating independent acquisition of resistance. This is not  
351 surprising since primary resistance was the main mode of MDR development in  
352 our samples. The opposite was observed for MDR isolates from Rio Grande do  
353 Sul by Pertzolo et al (2012)<sup>35</sup>, who had a large level of genotype clustering and  
354 concluded that these came mostly from strains that had been transmitted in the  
355 last few years.

356 Spoligotyping was also performed for all samples (Figure 1A). An  
357 updated version of the SpolDB4 database, the SITVIT2 proprietary database of  
358 the Institut Pasteur de la Guadeloupe, was used to identify all spoligotype  
359 patterns. Eighty-two isolates were classified into 5 distinct lineages (Figure 1A).  
360 Forty-six belonged to the Latin-America and Mediterranean (LAM) family, 17 to  
361 the T super-family, 12 to the Haarlem family, 6 to X2 family and 1 to the East  
362 African Indian (EAI) lineage. Recently, a large spoligotyping analysis revealed  
363 that the LAM, T and H lineages are the most frequently observed ones in  
364 Brazilian *M. tuberculosis* isolates.<sup>36</sup> Our study corroborates with these findings  
365 as we found very similar frequencies for these lineages in our MDR isolates.  
366 The other 17 isolates were classified as new (9 isolates) and unknown (8



367 isolates). Statistical analysis revealed that there are no significant differences in  
368 lineage frequencies between Rio de Janeiro samples and those from other  
369 states ( $p=0.43$ ). This indicates that our data are representative of the MDR  
370 strains that occur countrywide and could, therefore, be useful for the  
371 development of diagnostic tests for MDR-TB in Brazil (Table 4).

372 The isolates belonging to the LAM and T families were distributed into 8  
373 and 5 sublineages, respectively (Figure 1B and 1C). In the LAM family, 20  
374 isolates belonged to LAM9 and 9 to the LAM4 sublineages while for the T  
375 lineage, the T1 sublineage was the major one with 12 isolates. The Haarlem  
376 family isolates were also subdivided into H1 and H3 sublineages with 2 and 10  
377 isolates, respectively (data not shown). The *IS6110*-RFLP and spoligotyping  
378 patterns, octal number, SIT and lineage for each isolate can be observed in  
379 Supplementary Table S3. Curiously, the EAI lineage, that is phylogeographically  
380 specific of South-East Asia, India and East-Africa, was represented by one  
381 isolate from Parana state. This indicates that there may have been transmission  
382 from other continents.

383 The 11 *IS6110*-RFLP clusters were compared with spoligotyping data  
384 (Table 5). As expected, isolates belonging to the same RFLP cluster were of  
385 similar spoligotype lineages. Our data allowed us, through a paired analysis, to  
386 discriminate some *IS6110*-RFLP clusters by spoligotyping. We can observe that  
387 some isolates within the same *IS6110*-RFLP and spoligotyping cluster came  
388 from different Brazilian states and showed different mutations profiles. This  
389 reinforces the idea of independent acquisition of drug resistance in these  
390 clusters. We can also note that, in RFLP clusters 10 and 11, the isolates were  
391 identified as new profiles in the LAM sublineage. The 2 isolates in cluster 11

392 showed identical RFLP patterns and octal numbers and were tentatively  
393 identified as LAM3 sublineage members.

394 A clear relationship was observed between *KatG* and *rpoB* mutations  
395 within the spoligotype lineages (Table 6). Although codon 4 deletions were  
396 common in our isolates, the X2 lineage was the only clustered lineage that  
397 didn't show this profile. However, this lineage was the only one that had codon  
398 315 mutations in all members. Therefore, in countries where this lineage is  
399 common, MDR patient care should take into account that these patients may  
400 carry this mutation. Considering the Haarlem lineage, the *rpoB* gene showed an  
401 atypical behavior, with codon 516 being the most frequently altered followed by  
402 codons 526 and 531 ( $p < 0.0001$ ). However, for the other isolates the most  
403 commonly mutated codons were those normally seen in RMP resistant isolates  
404 worldwide (codons 531, 526 and 516).

405 One study analyzed 217 MDR *M. tuberculosis* isolates from Russia by  
406 spoligotyping, *IS6110*-RFLP and mutation screening of the *KatG* and *rpoB*  
407 genes.<sup>37</sup> Among these isolates, 46%, 10% and 2% belonged to the LAM, H and  
408 T lineages, respectively. The LAM isolates showed *rpoB* mutations in codon  
409 516 (75%) and 531 (7%) and also in *KatG* at codon 315 (99%). In our study,  
410 46.5% of the MDR isolates also belonged to the LAM lineage with a high  
411 frequency of codon 315 mutations (82.6%). However, for *rpoB* we observed  
412 codon 531 mutations in 60.9% of the isolates while only 2.2% had alterations in  
413 codon 516. No *kafG* mutations were observed in 43% of the H lineage Russian  
414 isolates against 16.7% in our study while for *rpoB*, 48% of these isolates had no  
415 mutations against only 8.3% in ours. However, our results are in agreement with  
416 another investigation conducted in Brazil<sup>35</sup>, where, in 121 MDR isolates from



417 Rio Grande do Sul state, 20% and 12% had no *KatG* or *rpoB* mutations,  
 418 respectively. Within the H lineage, codon 516 was the most frequently mutated  
 419 one in our isolates while the same was not observed for the Russian samples.  
 420 While only 4 T lineage isolates were observed in these samples, in our study we  
 421 had 17. Another major difference was seen for *rpoB* codon 531 that was the  
 422 most frequently mutated one in our study while no mutations were found in the  
 423 Russian samples. These results suggest that the frequency of certain mutations  
 424 in particular genotypic lineages are dependent on the geographical region of the  
 425 isolates.

426 Perizzolo *et al.* (2012)<sup>35</sup> also observed that only 4.1% of their samples  
 427 from Rio Grande do Sul state belonged to the Haarlem lineage. However, 12%  
 428 of our samples were of this lineage, which suggests that this difference may be  
 429 occurring only when the Rio Grande do Sul state is analyzed separately from  
 430 other Brazilian states. They also observed that the largest sublineage was  
 431 LAM5 (15%), one that is rarely observed among drug susceptible samples in  
 432 this region. In our study, the frequency of the LAM5 sublineage was low (3%),  
 433 which is similar to what is found in drug susceptible samples from Rio Grande  
 434 do Sul and reinforcing the idea that Perizzolo *et al.* (2012)<sup>35</sup> analyzed samples  
 435 from a specific MDR outbreak. Concerning the type of mutations found in LAM5,  
 436 both studies showed similar findings, with one isolate that had no mutations and  
 437 several isolates with mutations in codons 531 (*rpoB*) and 315 (*KatG*). The  
 438 mutation profile in this sublineage seems to be very similar in Brazilian isolates.

439 The two main groups of spoligotyping lineages found in our study, LAM  
 440 (46%) and T (17%), were compared with their respective mutation profiles  
 441 (Table 7). There were some associations between *KatG* alterations and the

sublineages. LAM6 and LAM9 carry a higher number of *KatG1* deletions than the other LAM sublineages ( $p=0,008$ ). Furthermore, all isolates belonging to lineages LAM and T also had mutations in codon 315 in *KatG2*. Another interesting finding is that the T lineage shows much lower mutation diversity in both *rpoB* and *KatG* than LAM.

MDR-TB is one of the most important threats for TB control. Sensitivity tests of first line drugs strongly influence patient care and the utilization of resources before the treatment. In this work, a correlation of drug resistance profiles with *IS6110* fingerprinting clusters and *rpoB* and *KatG* mutations was attempted in order to determine possible associations. We found that isolates belonging to the same cluster did not necessarily show the same resistance or mutation profile, indicating that genotyping to strain level cannot predict resistance in this set of samples. This type of investigation can be optimized by a new Luminex® based method, the Spoligotyping that allows the simultaneous assessment of the main *rpoB* mutation SNPs (codons 516, 526 and 531), the main mutations in genes related to INH resistance (*KatG* 315, *inhA* -15) and spoligotyping.<sup>45</sup>

Although most isolates came from Rio de Janeiro, we also analyzed isolates from other 11 Brazilian states, as shown in Table 4. Thus, we were able to draw a profile of *rpoB* and *KatG* mutations throughout the Brazilian territory. Even though alterations in at least three genes (*KatG*, *inhA* and *ahpC*) are associated with INH resistance, our analysis, as confirmed in other studies, shows that *KatG* mutations are good predictors of resistance to this drug because of our INH resistant isolates, 93% carried mutations in this gene. Of these, 89% had mutations in codon 315 with a predominance of the Ser315Thr substitution. This profile is consistent with findings from other countries<sup>30,31,40,41,42</sup> and also with

467 previous studies of Brazilian MDR isolates.<sup>15,43</sup> In spite of that, one study with  
468 INH resistant Brazilian isolates from Goiás state,<sup>6</sup> found a lower prevalence of  
469 codon 315 *KatG* mutations (6 of 17), raising the question of whether  
470 geographical strain differences could be responsible for this variation. However,  
471 as mentioned above, we analyzed isolates from several Brazilian regions and  
472 retrieved similar mutation profiles to those observed worldwide.

473 According to Costa et al (2009)<sup>46</sup>, there is an association between the *KatG*  
474 315 mutation and the H lineage in strains from South America (Brazil, Peru and  
475 Argentina) but there is no association when compared with the LAM lineage. In  
476 contrast, we had a high number of 315 mutations in these two lineages.  
477 Although the Ser315Thr mutation results in an enzyme without the ability to  
478 activate INH, it retains approximately 50% of the catalase-peroxidase activity.<sup>47</sup>  
479 Therefore, this altered enzyme provides high-level resistance to INH while still  
480 keeping a level of oxidative protection that creates a clear advantage for the  
481 isolates that carry it.

482 In the present study, we correlated data from resistance and mutation  
483 profiles with spoligotyping and *IS6110*-RFLP cluster analysis. Such data are  
484 highly relevant for the study of global TB transmission. One study with 99 MDR  
485 isolates from Portugal, for example, showed that *IS6110*-RFLP in association  
486 with *rpoB* mutation analysis can be useful to unambiguously confirm isolate  
487 identities and to propose epidemiological links.<sup>48</sup> Another study with 114  
488 isolates recovered from patients of a Russian prison,<sup>49</sup> determined the active  
489 transmission of MDR isolates between prisoners through the high rate of MDR  
490 and the identical RFLP patterns, spoligotypes and *rpoB* mutations among new

491 cases. The high proportion of clustered isolates (79.8%) in this study indicates  
492 active and recent transmission of the disease.

493 In spite of being a high TB and HIV burden country, our study is the first  
494 Brazilian investigation that compares *rpoB* and *katG* gene mutations with  
495 *IS6110*-RFLP and spoligotype fingerprints in MDR isolates from different  
496 regions. These data are useful to enhance our understanding of the  
497 mechanisms of resistance and their relationship with certain lineages.  
498 Furthermore, resistance profiles were well established in the present study  
499 among the main lineages found in Brazilian isolates (LAM and T), thus providing  
500 useful data for patient management and treatment in this country. Additionally,  
501 the characterization of these MDR isolates could aid in the development of  
502 diagnostic tools as well as guide new strategies to fight MDR-TB in Brazil.

503

#### 504 **Acknowledgements**

505 We thank the Centro de Referência Professor Heitor Fraga (Fundação Oswaldo  
506 Cruz-FIOCRUZ-Brazil) for providing bacterial strains.

#### 507 **Funding**

508 This study was supported financially by the Conselho Nacional de  
509 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil) and Faperj.

510

#### 511 **Transparency declarations**

512 None to declare.

513

#### 514 **Supplementary data**

Figure S1 and Tables S1, S2 and S3 are available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

## References

- 1 World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO Report; 2012. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf). Geneva, World Health Organization.
- 2 Caws, M., Thwaites, G., Dunstan, S., Hawn, T.R., Lan, N.T.N., Thuong, N.T., Stepniewska, K., Huyen, M.N., Bang, N.D., Loc, T.H., Gagneux, S., van Soolingen, D., Kremer, K., van der Sande, M., Small, P., Anh, P.T., Chinh, N.T., Quy, H.T., Duyen, N.T., Tho, D.Q., Hieu, N.T., Torok, E., Hien, T.T., Dung, N.H., Nhu, N.T., Duy, P.M., van Vinh Chau, N., Farrar, J. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos Pathol* 2008; **4** (3): e34.
- 3 Dalcolmo MP, Andrade MKN, Picon PD. Multiresistant tuberculosis in Brazil: history and control. *Rev Saúde Pública* 2007; **41**(Supl. 1).
- 4 Valim, A.R., Possuelo, L.G., Cafrune, P.I., Borges, M., Ribeiro, M.O., Rossetti, M.L., Zaha, A. Evaluation and genotyping of multidrug-resistant cases of tuberculosis in Southern Brazil. *Microb. Drug Resist* 2006; **12** (3): 186–191.
- 5 Kremer, K., Glynn, J.R., Lillebaeck, T., Niemann, S., Natalia, E. *et al.* Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *J. Clin. Microbiol* 2004; **42**: 4040-4049.
- 6 Santos, L. C., Bousquet, H. M., Pereira, A. M., Junqueira-Kipnis, A. P., Kipnis, A. A high prevalence of resistance in new tuberculosis cases of Midwestern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 2010; **10**: 1052-1057.
- 7 Lasunskala E, Ribeiro SCM, Manicheva O *et al.* Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes and Infection* 2010; **12** (6): 467-475.
- 8 O'Sullivan, D. M., McHugh, T. D. and Gillespie, S. H. Analysis of *rpoB* and *pncA* mutations in the published literature: an insight into the role of oxidative stress in *Mycobacterium tuberculosis* evolution?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005. **55**: 674-679.

- 545 9 Ramaswamy S, Musser J. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in  
546 *Mycobacterium tuberculosis*: update. *Tuber Lung Dis* 1998; **79**: 3-29.
- 547 10 Möller B, Borrell S, Rose G, Gagneux S. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant  
548 *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Genet* 2013; **29** (3):160-169.
- 549 11 Siu GK, Tam YH, Ho PL, Lee AS, Que TL, Tse CW, Yip KT, Lam JT, Cheng VC, Yuen KY,  
550 Yam WC. Direct detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory  
551 specimens by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*  
552 2011; **69**: 51-58.
- 553 12 Rouse DA, DeVito JA, Li Z, Byer H, Morris SL. Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of  
554 *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance.  
555 *Mol Microbiol* 1996; **22**(3): 583-92.
- 556 13 Slayden RA, Barry CE. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in  
557 *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection* 2000; **2**: 659-669.
- 558 14 Somoskovi A, Parsons LM, Salinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid,  
559 rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Resp Res*. 2001; **2**: 164-168.
- 560 15 Hötting C C, Pavan EM, Gianpaglia CMS, Ferrázoli L, Aily DCG, Albuquerque, DM, Ramos  
561 MC. Prevalence of *KatG* Ser315 substitution and *rpoB* mutations in isoniazid resistant  
562 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *Int. J. Tuberc Lung Dis* 2005; **9**(1): 87-93.
- 563 16 Jackson AD, Seagar A L, Reid ME, Dolg C, Forbes KJ, Laurenson I F, McMenamin J.  
564 Characterising transmission of a tuberculosis genotype in Scotland: a qualitative approach to  
565 social network enquiry. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases* 2009.  
566 **13**(4):486-493.
- 567 17 Baranov AA, Marandyshev AO, Mannsåker T, Dahle UR, Bjune GA. Molecular epidemiology  
568 and drug resistance of widespread genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in northwestern  
569 Russia. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases* 2009; **13**(10):1288-1293.
- 570 18 Cave MD, Murray M, Nardell E. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. In:  
571 Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs, Jr W, editors. *Tuberculosis and the tubercle*  
572 *bacillus*. Washington, DC: ASM Press; 2005. p. 33-46.
- 573 19 Zumárraga MJ, Martín C, Samper S, Alito A, Latini O, Bigl F, Roxo E, Cicuta ME, Errico F,  
574 Ramos MC, Cataldi A, Van Soolingen D and Romano MI. Usefulness of Spoligotyping in

- 575 Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis*-Related Infections in South America. Journal  
576 of Clinical Microbiology 1999; **37**(2):296-303.
- 577 **20** Doroudchi M, Kremer K, Basiri EA, Kadivar MR, Van Soolingen D, Ghaderi AA. IS6110-  
578 RFLP and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Iran. Scand J Infect Dis  
579 2000; **32**(6):663-8.
- 580 **21** Filliol I, Driscoll JR, Van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valétudie G, Dang DA,  
581 Barlow R, Banerjee D, Bifani PJ *et al*. Snapshot of moving and expanding clones of  
582 *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an  
583 international study. J Clin Microbiol 2003; **41**(5):1963-1970.
- 584 **22** Durmaz R, Zozio T, Gunal S, Yaman A, Cavusoglu C, Guney C, Sola C, Rastogi N. Genetic  
585 diversity and major spoligotype families of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical  
586 isolates from different regions of Turkey. Infect Genet Evol 2007; **7**(4):513-519.
- 587 **23** Kisa O, Tarhan G, Gunal S, Albay A, Durmaz R, Saribas Z, Zozio T, Alp A, Ceyhan I,  
588 Tombak A, Rastogi N. Distribution of Spoligotyping Defined Genotypic Lineages among Drug-  
589 Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Clinical Isolates in Ankara, Turkey. PLoS ONE  
590 2012; **7**(1): e30331.
- 591 **24** Dalcolmo MP. Treatment of Drug-Sensitive and Drug-Resistant forms of tuberculosis.  
592 Pulmão RJ 2012; **21**(1):55-59.
- 593 **25** Canetti G, Rist N, Grosset J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues  
594 antibacillaires par la méthode des proportions. Méthodologie, critères de résistance, résultats,  
595 interprétation. Rev Tuberc Pneumol 1963; **27**:217-272.
- 596 **26** Van Soolingen D, Hermans PWM, Haas PEW, Soll DR, Van Embden JDA. Occurrence and  
597 stability of insertion sequence in *Mycobacterium tuberculosis* complex strain: evaluation of an  
598 insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis.  
599 J. Clin. Microbiol 1991; **29**:2578-2586.
- 600 **27** Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis*  
601 by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993;  
602 **31**:406-409.



- 603 **28** Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A et al. Simultaneous detection and strain differentiation of  
 604 *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*  
 605 1997; **35**:314-907.
- 606 **29** Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity:  
 607 mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population  
 608 genetics and epidemiology. *BMC Microbiology* 2006; (6):23.
- 609 **30** Chan RC, Hui M, Chan EW, Au TK, Chin ML, Yip CK, AuYeung CK, Yeung CY, Kam KM,  
 610 Yip PC, Cheng AF. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium*  
 611 *tuberculosis* isolates in Hong Kong. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; **59**(5):866-73.
- 612 **31** Valvatne H, Syre H, Kross M, Stavrum R, Ti T, Phyu S and Grewal H. Isoniazid and  
 613 rifampicin resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Yangon,  
 614 Myanmar: Implications for rapid molecular testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009;  
 615 **64**: 694-701.
- 616 **32** Valim ARM, Rossetti MLR, Ribeiro MO and Zaha A. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-  
 617 resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *J Clin Microbiol* 2000. **38**:3119-3122.
- 618 **33** Yue J, Shi W, Xie J, Li Y, Zeng E and Wang H. Mutations in *rpoB* gene of multidrug-resistant  
 619 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J. Clin. Microbiol* 2003. **41**: 2209-2212.
- 620 **34** Jou R, Chen HY, Chiang CY, Yu MC and Su IJ. Genetic diversity of multidrug-resistant  
 621 *Mycobacterium tuberculosis* isolates and identification of 11 novel *rpoB* alleles in Taiwan.  
 622 *Journal of Clinical Microbiology* 2005. **43**:1390-1394.
- 623 **35** Pertzolo, P. F., Costa, E. R. D., Ribeiro, A. W., Spies, F. S., Ribeiro, M. O., Dias, C. F.,  
 624 Unis, G., Silva, P. A., Gomes, H. M., Sutfys, P. N., Rossetti, M. L. R. Characteristics of  
 625 multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Southern Brazil. *Tuberculosis* 2012. **92**: 56-  
 626 59.
- 627 **36** Gomes, H. M., Elias, A. R., Oelemann, M. A. C., Pereira, M. A. S., Montes, F. F. O., Marsico,  
 628 A. G., Kritski, A. L., Filho, L. A., Caldas, P. C., Possuelo, L. G., Cafrune, P., Rossetti, M. L.,  
 629 Luena, N., Saad, M. H. F., Cavalcanti, H. R., Leite, C. Q. F., Brito, R. C., Lopes, M. L., Uma,  
 630 K., Souza, M., Trindade, R. C., Zozio, T., Sola, C., Rastogi, N., Sutfys, P. N. Spoligotypes of  
 631 *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residentes of 11 states of Brazil.  
 632 *Infection, Genetics and Evolution* 2011. **12**: 649-656.



- 633 **37** Lipin MY, Stepanshina VN, Shemyakin IG and Shinnick TM. Association of specific  
634 mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant  
635 *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. Clin Microbiol Infect 2007; **13**: 620–626.
- 636 **38** Siqueira HR, Freitas FAD, Oliveira DN, Barreto AMW, Dalcolmo MP, Albano RM. Isoniazid-  
637 resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains arising from mutations in two different regions of  
638 the *katG* gene. J Bras Pneumol 2009; **35**(8):773–779.
- 639 **39** Marttila HU, Soini H, Eerola E, Vyshnevskaya E, Vyshnevskiy BI, Otten TF, Vasilyef AV,  
640 Viljanen MK. A Ser315Thr Substitution in KatG Is Predominant in Genetically Heterogeneous  
641 Multidrug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Originating from the St. Petersburg  
642 Area in Russia. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1998; **42**(9):2443–2445
- 643 **40** Afanas'ev MV, Ikryannikova LN, Il'ina EN, Sidorenko SV, Kuz'min AV, Larionova EE, et al.  
644 Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*  
645 isolates from the Russian Federation. J Antimicrob Chemother. 2007;**59**(6):1057–64.
- 646 **41** Araya P, Velasco M, Toqnarelli J, Arias F, Leiva T, Scapaticcio A, Amiz P, Fernández J.  
647 Detection of genes associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolated in  
648 Chile. Rev. Med Chile 2011. **4**:467–473.
- 649 **42** Kozhamkulov U, Akhmetova A, Rakhimova S, Belova E, Alenova A, Bismilda V, Chingissova  
650 L, Ismailov S, Ramanzulov E, Momynaliev K. Molecular characterization of rifampicin- and  
651 isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Kazakhstan. Jpn J Infect Dis  
652 2011. **64**(3):253–255.
- 653 **43** Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, Leite C Q F, Sato D  
654 N, Shikama ML, Mamizuka EM, Hirata RDC, Hirata MH. Screening and Characterization of  
655 mutations on Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates obtained in Brazil.  
656 Antimicrobial Agents Chemotherapy 2004. **48**(9):3373–3381.
- 657 **44** Da Silva PE, Von Groll A, Martin A, Palomino JC. Efflux as a mechanism for drug resistance  
658 in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbiol 2011. **63**(1):1–9.
- 659 **45** Gornimbou MK, Abadia E, Zhang J, Retrégier G, Panaiotov S, Bachyska E and Sola C.  
660 "Spoligotyping," a Dual-Priming-Oligonucleotide-Based Direct-Hybridization Assay for  
661 Tuberculosis Control with a Multianalyte Microbead-Based Hybridization System. J Clin  
662 Microbiol 2012; **50**(10):3172–3179.

- 663 **46** Costa ERD, Ribeiro MO, Silva MSN, Arnold LS, Rostrolla DC, Cafrune PI, Espinoza RC,  
 664 Palaci M et al. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and *in vitro*  
 665 susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families  
 666 from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiology* 2009, **9**:39.
- 667 **47** Rouse DA, Devito JA, Li Z, Byer H, Morris SL. Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of  
 668 *Mycobacterium tuberculosis* effects on catalase-peroxidase activities and isoniazida resistance.  
 669 *Molecular Microbiology* 1996, **22**(3):583-92.
- 670 **48** Portugal I, Mala S and Moniz-pereira J. Discrimination of Multidrug-Resistant *Mycobacterium*  
 671 *tuberculosis* IS6110 Fingerprint Subclusters by *rpoB* Gene Mutation Analysis. *Journal of Clinical*  
 672 *Microbiology* 1999, **37**(9):3022-3024.
- 673 **49** Tsoungoussova OS, Mariandyshev A, Bljune G, Sandven P and Caugant DA. Molecular  
 674 Epidemiology and Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in the Archangel  
 675 Prison in Russia: Predominance of the W-Beijing Clone Family. *Clinical Infectious Diseases*  
 676 2003, **37**:665-72.

685 Table 1. Resistance patterns of the 99 MDR isolates analyzed

| INH | Resistance pattern |     |    | n  |
|-----|--------------------|-----|----|----|
|     | RMP                | EMB | ST |    |
| R   | R                  | S   | S  | 32 |
| R   | R                  | R   | R  | 25 |
| R   | R                  | R   | S  | 23 |
| R   | R                  | R   | ND | 4  |
| R   | R                  | ND  | ND | 3  |
| R   | R                  | S   | R  | 8  |
| R   | R                  | ND  | R  | 2  |
| R   | R                  | S   | ND | 2  |

686 R-Resistant  
 687 S-Sensitive  
 688 ND-Not determined

Table 2. Mutation patterns for the *rpoB* and *KatG* genes found in 99 MDR isolates

| Gene         | Mutated codon | Mutation                     |                   | n  |
|--------------|---------------|------------------------------|-------------------|----|
|              |               | Specific Mutation            | Amino acid change |    |
| <i>rpoB</i>  | 531           | TCG - TTG                    | Ser - Leu         | 44 |
|              |               | TCG - TGG                    | Ser - Trp         | 7  |
|              | 513           | CAA - CCA                    | Gln - Pro         | 2  |
|              | 516           | GAC - GTC                    | Asp - Val         | 3  |
|              |               | GAC - TAC                    | Asp - Tyr         | 8  |
|              | 526           | CAC - GAC                    | His - Asp         | 9  |
|              |               | CAC - TAC                    | His - Tyr         | 8  |
|              |               | CAC - CGC                    | His - Arg         | 2  |
|              |               | CAC - TGC                    | His - Cys         | 2  |
|              |               | CAC - AAC                    | His - Asn         | 2  |
|              | 511           | CTG - CCG                    | Leu - Pro         | 4  |
|              | 475*          | GTG - GGG                    | Val - Gly         | 1  |
|              | 522*          | TCG - TTC                    | Ser - Phe         | 1  |
|              | 539*          | TCA - TTC                    | Ser - Phe         | 1  |
|              | 533           | CTG - CCG                    | Leu - Pro         | 1  |
|              | 545           | CTG - CCG                    | Leu - Pro         | 2  |
|              | 508*          | ACC - CCC                    | Thr - Pro         | 1  |
|              | 471*          | ATG - ATT                    | Met - Ile         | 1  |
| <i>KatG1</i> | 4             | A deletion at position 60    |                   | 26 |
|              | 65*           | G deletion at position 241   |                   | 2  |
|              | 17*           | AGC - ACC                    | Ser - Thr         | 1  |
|              | 92-93*        | T insertion at position 325  |                   | 1  |
|              | 2*            | C deletion at position 54    |                   | 1  |
|              | 11*           | C deletion at position 81    |                   | 1  |
|              | 26*           | G deletion at position 126   |                   | 1  |
|              | 107           | G deletion at position 368   |                   | 1  |
|              | 67            | G deletion at position 249   |                   | 1  |
|              | 115*          | T insertion at position 392  |                   | 1  |
|              | 1*            | GTG - GCG                    | Val - Ala         | 1  |
|              | 93            | GCC - ACC                    | Ala - Thr         | 1  |
| <i>KatG2</i> | 315           | AGC - ACC                    | Ser - Thr         | 75 |
|              |               | AGC - AAC                    | Ser - Asn         | 3  |
|              |               | AGC - ACA                    | Ser - Thr         | 3  |
|              |               | AGC - ATC                    | Ser - Ile         | 1  |
|              |               | CGG - CTG                    | Arg - Leu         | 2  |
|              | 463           |                              |                   | 1  |
|              | 431           | G deletion at position 1293  |                   | 1  |
|              | 399*          | GAA - GAG                    | Glu - Glu         | 2  |
|              | 493*          | A deletion at position 1525  |                   | 1  |
|              | 439           | G insertion at position 1365 |                   | 1  |
|              | 485*          | G deletion at position 1501  |                   | 1  |

\*associated with another mutated codon

693 **Table 3.** IS6110-RFLP fingerprint clusters and *rpoB* and *KatG* mutations for clustered samples

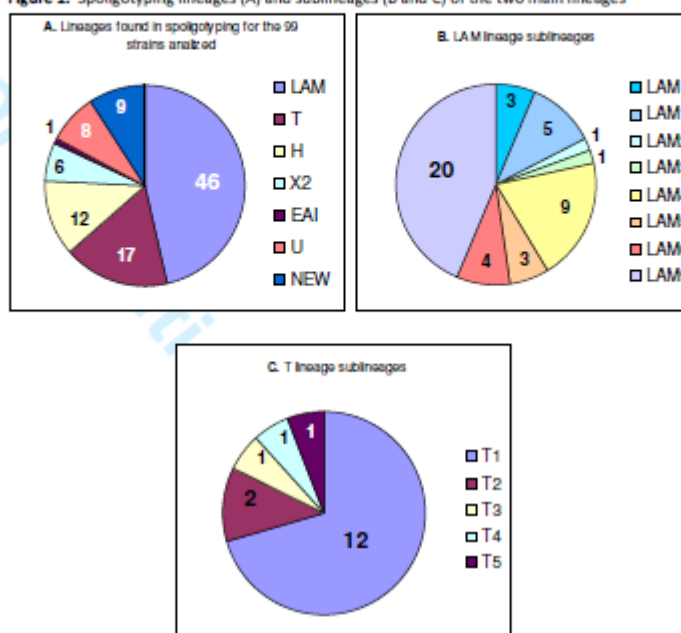
| Cluster | Isolate code | Resistance profile | <i>rpoB</i> mutation | <i>KatG</i> mutation |
|---------|--------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| 1       | 2316/02      | INH, RMP           | Ser531Leu            | Ser315Thr, Del 4     |
|         | 2410/02PA*   | INH, RMP, EMB, ST  | His526Cys            | Ser315Thr            |
| 2       | 235/03       | INH, RMP, EMB      | Ser531Trp            | Ser315Thr, Del 4     |
|         | 243/03       | INH, RMP, EMB      | Ser531Trp            | Ser315Thr            |
| 3       | 274/03       | INH, RMP, EMB      | Ser531Leu            | Ser315Thr            |
|         | CE02         | INH, RMP, ST       | NM                   | Ser315Thr            |
|         | MG 285       | INH, RMP           | NM                   | Ser315Thr            |
| 4       | 009/03       | INH, RMP, EMB, ST  | Ser531Trp            | Ser315Thr            |
|         | 720/03       | INH, RMP, EMB, ST  | Ser531Trp            | Ser315Thr            |
| 5       | 2475/02      | INH, RMP, EMB, ST  | Ser531Leu            | Ser315Thr            |
|         | 682/03       | INH, RMP           | Ser531Leu            | Ser315Thr            |
| 6       | 1275/03      | INH, RMP, ST       | Asp516Tyr            | Ser315Asn            |
|         | 2010/97      | INH, RMP, EMB, ST  | Gln513Pro            | Ser315Thr            |
|         | 865/03       | INH, RMP           | Ser531Leu            | Ser315Thr/Del 485    |
| 7       | 1194/03      | INH, RMP, EMB, ST  | His526Asp            | Ser315Thr            |
|         | 529/03MA     | INH, RMP           | His526Tyr            | Ser315Thr, Del 4     |
| 8       | 847/03       | INH, RMP, EMB, ST  | Leu511Pro            | Ser315Thr            |
|         | 850/03       | INH, RMP, EMB, ST  | Asp516Tyr            | Ser315Thr, Del 4     |
|         |              |                    | Asp516Tyr            |                      |
| 9       | 1010/03      | INH, RMP, EMB      | Ser531Leu            | Ser315Thr            |
|         | PE76         | INH, RMP           | His526Tyr            | Ser315Thr            |
|         | PA107        | INH, RMP, ST       | NM                   | Ser315Thr            |
| 10      | 1221/03      | INH, RMP           | Ser531Leu            | Ser315Thr            |
|         | 480/03       | INH, RMP           | His526Asn            | Ser315Thr, Del 4     |
| 11      | 1269/03      | INH, RMP           | Ser531Leu            | Ser315Thr            |
|         | 276/03       | INH, RMP           | Ser531Leu            | Ser315Thr, Del 4     |

NM- No mutations in the studied region.

\*The Brazilian state from where the isolate was obtained is indicated as PA-Pará state; AM-Amazonas state; MA-Maranhão state. All the other isolates came from Rio de Janeiro state.

The susceptibility tests for pyrazinamide (PZA) were also conducted but these results were mostly inconclusive and therefore omitted.

706 **Figure 1.** Spoligotyping lineages (A) and sublineages (B and C) of the two main lineages



719 **Table 4.** Demographic data and TB incidence in different Brazilian regions

| Brazilian regions | States            | Population <sup>a</sup> | TB incidence <sup>b</sup> | Number (%) of isolates in study |
|-------------------|-------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| North             | Amazonas          | 3,221,939               | 66.71                     | 3 (3.0%)                        |
|                   | Pará              | 7,065,573               | 45.78                     | 5 (5.0%)                        |
| Northeast         | Ceará             | 8,185,286               | 41.99                     | 2 (2.0%)                        |
|                   | Pernambuco        | 8,485,386               | 47.81                     | 5 (5.0%)                        |
|                   | Maranhão          | 6,118,995               | 39.73                     | 4 (4.0%)                        |
|                   | Paraíba           | 3,641,395               | 27.56                     | 3 (3.0%)                        |
|                   | Bahia             | 14,080,654              | 41.25                     | 2 (2.0%)                        |
| Central west      | Goiás             | 5,647,035               | 14.59                     | 3 (3.0%)                        |
| Southeast         | Minas Gerais      | 19,273,506              | 23.99                     | 4 (3.0%)                        |
|                   | Rio de Janeiro    | 15,420,375              | 73.27                     | 53 (53.53%)                     |
|                   | São Paulo         | 39,827,570              | 36.51                     | 6 (6.0%)                        |
| South             | Paraná            | 10,284,503              | 24.70                     | 7 (7.0%)                        |
|                   | Rio Grande do Sul | 10,582,840              | 41.51                     | 2 (2.0%)                        |

720 <sup>a</sup>From: <http://saladeprensa.ibge.gov.br/en/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=1065>  
 721 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, population in 2007)

722 <sup>b</sup>From: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defhttm.exe?db2009/d0202.def> (Indicadores e Dados  
 723 Básicos-IBD, Tb incidence in 2007)

724 Incidence rate: new cases/100,000 inhabitants

Table S: IS6110-RFLP cluster patterns and their corresponding shared types

| RFLP Cluster | Isolate Code (Spotting) | Lineage (Spotting) | IS6110 RFLP Profile | (BIT) Octal Number and Spotting Description |
|--------------|-------------------------|--------------------|---------------------|---|
| 1            | 2315/02                 | T1                 |                     |   |
|              | 2410/02                 | T1                 |                     |   |
|              | 235/03                  | T1                 |                     |   |
| 2            | 243/03                  | T1                 |                     |   |
|              | 274/03                  | LAM4               |                     |   |
|              | CE02                    | LAM4               |                     |   |
| 3            | M3285                   | LAM4               |                     |   |
|              | 009/03                  | LAM9               |                     |   |
|              | 720/03                  | LAM9               |                     |   |
| 4            | 2475/02                 | U                  |                     |   |
|              | 682/03                  | U                  |                     |   |
|              | 1275/03                 | X2                 |                     |   |
| 5            | 2010/07                 | X2                 |                     |   |
|              | 885/03                  | X2                 |                     |   |
|              | 1194/03                 | H3                 |                     |   |
| 6            | 529/03                  | H3                 |                     |   |
|              | 847/03                  | H3                 |                     |   |
|              | 859/03                  | H3                 |                     |   |
| 7            | 1010/03                 | X2                 |                     |   |
|              | PE76                    | X2                 |                     |   |
|              | PA107                   | X2                 |                     |   |
| 8            | 1221/03                 | NEW / LAM          |                     |   |
|              | 480/03                  | NEW / LAM          |                     |   |
|              | 1359/03                 | NEW / LAM3         |                     |   |
| 9            | 275/03                  | NEW / LAM3         |                     |   |
|              |                         |                    |                     |   |
|              |                         |                    |                     |   |

Only clusters formed in RFLP are shown

**Table 6.** Association between spoligotyping lineages and *rpoB* and *KatG* mutations in 99 MDR strains

| Characteristic  | Number (%) * of Isolates |            |           |           |          | Total |
|-----------------|--------------------------|------------|-----------|-----------|----------|-------|
|                 | Spoligotype lineage      |            |           |           |          |       |
|                 | LAM                      | T          | H         | X2        | EAI 1    |       |
| A.rpoB mutation |                          |            |           |           |          |       |
| 531             | 27 (58.7%)               | 11 (57.9%) | 1 (7.7%)  | 2 (33.3%) | 0 (0%)   | 41    |
| 526             | 11 (23.9%)               | 2 (10.5%)  | 4 (30.8%) | 1 (16.7%) | 1 (25%)  | 19    |
| 516             | 1 (2.2%)                 | 2 (10.5%)  | 6 (46.1%) | 1 (16.7%) | 0 (0%)   | 10    |
| Other mutations | 6 (13%)                  | 2 (10.5%)  | 2 (15.4%) | 1 (16.7%) | 0 (0%)   | 11    |
| B.KatG mutation |                          |            |           |           |          |       |
| 315             | 37 (80.4%)               | 13 (72.2%) | 9 (75.0%) | 6 (100%)  | 1 (100%) | 66    |
| Del 4           | 11 (23.9%)               | 6 (33.3%)  | 4 (30.8%) | 0 (0%)    | 1 (100%) | 22    |
| Other mutations | 14 (30.4%)               | 3 (15.8%)  | 1 (7.7%)  | 1 (16.7%) | 0 (0%)   | 20    |
| Total (A+B)     | 107                      | 39         | 27        | 12        | 3        | 189   |

\*The percentage of mutations refers to the total number of mutations in each isolate. The Unknown and New types were excluded from this table.



Table 7. The main spot-typing lineages with all associated mutation profiles

| Clade | Number of isolates | <i>gusB</i> mutations  | <i>KatG1</i> mutations*                                    | <i>KatG2</i> mutations*    |
|-------|--------------------|--|--|----------------------------|
| LAM   | 3                  | S31 (2)*, S26 (1)  | NM   | 315 (2)                    |
| LAM 1 | 5                  | S31 (3), S26 (2), S11 (1)                                      | Del 4 (1)  | 315 (5)                    |
| LAM 2 | 1                  | S31 (1)  | Del 4 (1)  | 315 + 399 (1)              |
| LAM 3 | 1                  | S31 (1)  | 17, Ins 92-93 (1)  | 315 (1)                    |
| LAM 4 | 9                  | S31 (3), S26 (4), S08 (1)                                      | NM   | 315 (9), 493 (1)           |
| LAM 5 | 3                  | S31 (2)  | NM   | 315 (2)                    |
| LAM 6 | 4                  | S31 (4)  | Del 2 (1), Del 4 (3), Del 11 (1), Del 65 (1)               | 315 (1), Del 431 (1)       |
| LAM 9 | 20                 | S31 (11), S26 (4), S16 (1), S22 (1), S39 (1), S45 (1), S33 (1) | Del 4 (6), Del 26 (1), Del 65 (1), Del 67 (1), Del 107 (1) | 315 (16), 399 (1), 463 (1) |
| T 1   | 12                 | S31 (8), S26 (2), S16 (1), S13 (1)                             | Del 4 (3)  | 315 (9), 439 (1)           |
| T 2   | 2                  | S31 (2)  | Del 4 (1), Ins 115 (1)                                     | 315 (1)                    |
| T 3   | 1                  | S16 (1)  | Del 4 (1)  | 315 (1)                    |
| T 4   | 1                  | S11 (1)  | Del 4 (1)  | 315 + 463 (1)              |
| T 5   | 1                  | S31 (1)  | NM   | 315 (1)                    |

NM = No mutation

\**KatG1* mutations and *KatG2* mutations refer to mutations in the first and in the second regions of the gene analyzed, respectively.

\*The numbers in brackets mean the number of times that each mutation appears.



**Figure S1:** Map of Brazil showing the different states and the number of isolates analyzed. States: AM – Amazonas; PA – Pará; MA – Maranhão; CE – Ceará; PB – Paraíba; PE – Pernambuco; BA – Bahia; GO – Goiás; MG – Minas Gerais; RJ – Rio de Janeiro; SP – São Paulo; PR – Paraná; RS – Rio Grande do Sul.

Table S1: Susceptibility patterns for the 99 MDR isolates analyzed.

| Isolate code | Resistance pattern |     |     |    |
|--------------|--------------------|-----|-----|----|
|              | INH                | RMP | EMB | ST |
| 111          | R                  | R   | S   | S  |
| 009          | R                  | R   | R   | R  |
| 039          | R                  | R   | S   | S  |
| 1010         | R                  | R   | R   | S  |
| 1085         | R                  | R   | R   | —  |
| 1126         | R                  | R   | R   | —  |
| 1194         | R                  | R   | R   | R  |
| 1205         | R                  | R   | —   | —  |
| 1221         | R                  | R   | S   | S  |
| 1251         | R                  | R   | S   | S  |
| 1264         | R                  | R   | R   | S  |
| 1269         | R                  | R   | S   | S  |
| 1275         | R                  | R   | S   | R  |
| 1314         | R                  | R   | R   | S  |
| 1316         | R                  | R   | R   | R  |
| 1411         | R                  | R   | R   | S  |
| 156          | R                  | R   | —   | R  |
| 1576         | R                  | R   | S   | S  |
| 1740         | R                  | R   | R   | R  |
| 2010/02      | R                  | R   | R   | R  |
| 2010/97      | R                  | R   | R   | R  |
| 2056         | R                  | R   | R   | R  |
| 2153         | R                  | R   | R   | R  |
| 2197         | R                  | R   | S   | R  |
| 229          | R                  | R   | S   | R  |
| 2316         | R                  | R   | S   | S  |
| 232          | R                  | R   | R   | —  |
| 235          | R                  | R   | R   | S  |
| 2355         | R                  | R   | R   | R  |
| 2410         | R                  | R   | R   | R  |
| 2414         | R                  | R   | R   | S  |
| 2417         | R                  | R   | S   | S  |
| 243          | R                  | R   | R   | S  |
| 247          | R                  | R   | R   | R  |
| 2475         | R                  | R   | R   | R  |
| 2505         | R                  | R   | R   | S  |
| 262          | R                  | R   | R   | R  |
| 263          | R                  | R   | R   | R  |
| 265          | R                  | R   | R   | S  |
| 2668         | R                  | R   | R   | S  |
| 2678         | R                  | R   | R   | S  |
| 2688         | R                  | R   | R   | S  |

Table S1 (Continued)

|      |   |   |   |   |
|------|---|---|---|---|
| 2689 | R | R | R | R |
| 2697 | R | R | S | S |
| 270  | R | R | S | S |
| 274  | R | R | R | S |
| 276  | R | R | S | S |
| 2788 | R | R | R | R |
| 2791 | R | R | R | S |
| 294  | R | R | S | R |
| 310  | R | R | R | R |
| 314  | R | R | R | S |
| 319  | R | R | S | S |
| 32   | R | R | R | S |
| 379  | R | R | S | S |
| 415  | R | R | R | R |
| 433  | R | R | R | S |
| 480  | R | R | S | S |
| 491  | R | R | S | R |
| 529  | R | R | S | S |
| 543  | R | R | S | S |
| 563  | R | R | R | S |
| 605  | R | R | — | — |
| 640  | R | R | S | — |
| 682  | R | R | S | S |
| 711  | R | R | S | S |
| 720  | R | R | R | R |
| 78   | R | R | R | R |
| 790  | R | R | S | S |
| 826  | R | R | R | — |
| 836  | R | R | S | S |
| 837  | R | R | R | R |
| 847  | R | R | R | R |
| 850  | R | R | R | R |
| 865  | R | R | S | — |
| 884  | R | R | R | S |
| 885  | R | R | R | R |
| 886  | R | R | R | S |
| 89   | R | R | — | — |
| 933  | R | R | R | S |
| 96   | R | R | — | R |
| 972  | R | R | R | S |
| 976  | R | R | R | S |
| 981  | R | R | R | R |
| 452  | R | R | S | S |
| 358  | R | R | S | S |
| 378  | R | R | S | S |

Table S1 (Continued)

|     |   |   |   |   |
|-----|---|---|---|---|
| 02  | R | R | S | R |
| 155 | R | R | S | S |
| 150 | R | R | S | S |
| 231 | R | R | S | S |
| 285 | R | R | S | S |
| 107 | R | R | S | R |
| 03  | R | R | S | S |
| 07  | R | R | S | S |
| 11  | R | R | S | S |
| 76  | R | R | S | S |
| 261 | R | R | S | R |
| 88  | R | R | S | S |

R – Resistant

S – Sensitive

ND – Not determined

Table S2: Mutational profiles of 99 multidrug resistant isolates.

| Isolate code | Gene        |                            |               |  | Kaif2         |                            |
|--------------|-------------|----------------------------|---------------|--|---------------|----------------------------|
|              | <i>rpoB</i> | Codon/amino acid change(s) | Mutated codon | Codon/amino acid change(s)             | Mutated codon | Codon/amino acid change(s) |
| 111          |             | Gln CAA - Phe CCA          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 9            |             | Ser TCG - Trp TGG          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 39           |             | Asp GAC - Val GTG          | -             | none                                   | -             | none                       |
| 1010         |             | Ser TCG - Leu TTG          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 1085         |             | Asp GAC - Tyr TAC          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 1126         |             | Ser TCG - Leu TTG          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 1194         |             | His CAC - Asp GAC          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 1205         |             | Ser TCG - Leu TTG          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 1221         |             | Val GTG - Gly GGG          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 1251         |             | Ser TCG - Leu TTG          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 1264         |             | none                       | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 1269         |             | Ser TCG - Leu TTG          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 1275         |             | Ser TCG - Leu TTG          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 1314         |             | Asp GAC - Tyr TAC          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 1316         |             | none                       | -             | none                                   | -             | none                       |
| 1411         |             | Ser TCG - Leu TTG          | 4 + 85        | 4 (Dw A) + 85 (Dw G)                   | -             | none                       |
| 1556         |             | Ser TCG - Leu TTG          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 1576         |             | Ser TCG - Leu TTG          | 17 + 82-83    | 17 (Ser AGC - Thr ACC) + 82-83 (Phe T) | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 1740         |             | Ser TCG - Leu TTG          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 2010/02      |             | Ser TCG - Leu TTG          | 2 + 4 + 11    | 2 (Dw G) + 4 (Dw A) + 11 (Dw C)        | 431           | Del (G)                    |
| 2010/97      |             | Ser TCG - Leu TTG          | 4             | 4 (Dw A)                               | -             | none                       |
| 2056         |             | Gln CAA - Phe CCA          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
|              |             | His CAC - Asp GAC          | 4             | 4 (Dw A)                               | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
| 2153         |             | Ser TCG - Leu TTG          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
|              |             | Ser TCG - Ser TTC          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |
|              |             | Ser TCA - Ser TTC          | -             | none                                   | 315           | Ser AGC - Thr ACC          |

Table S2: Mutational profiles of 99 multidrug resistant isolates. (Continued)

|      |     |                   |             |                                     |           |   |
|------|-----|-------------------|-------------|-------------------------------------|-----------|---|
| 2197 | 526 | His CAC - Tyr TAC | 4 + 26 + 65 | 4 (Dul A) + 26 (Dul G) + 65 (Dul G) | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2259 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | 107         | 107 (Dul G)                         | —         | none  |
| 2316 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | 4           | 4 (Dul A)                           | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 232  | 531 | Ser TCG - Tyr TGG | 4           | 4 (Dul A)                           | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 235  | 531 | Ser TCG - Tyr TGG | 4           | 4 (Dul A)                           | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2355 | 526 | His CAC - Arg CGC | 4           | 4 (Dul A)                           | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2410 | 526 | His CAC - Cys TGC | —           | none                                | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2414 | 511 | Leu CTG - Pro CCG | 4           | 4 (Dul A)                           | 315 + 403 | 315 (Ser AGC - Thr ACC) + 403 (CGG Arg - CTG Leu) |
| 2417 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | —           | none                                | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 243  | 531 | Ser TCG - Tyr TGG | —           | none                                | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 247  | 516 | Asp GAC - Tyr TAC | —           | none                                | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2475 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | —           | none                                | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2505 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | —           | none                                | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 252  | 526 | His CAC - Tyr TAC | 4           | 4 (Dul A)                           | 315       | Ser AGC - Thr ACC (2 nucleotides)                 |
| 253  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | —           | none                                | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 255  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | —           | none                                | 315 + 399 | 315 (Ser AGC - Thr ACC) + 399 (Glu GAA - Glu GAG) |
| 2568 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | 4           | 4 (Dul A)                           | 315 + 403 | 315 (Ser AGC - Thr ACC) + 403 (Dul A)             |
| 2578 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | 67          | 67 (Dul G)                          | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2588 | 516 | Asp GAC - Val GTG | 4           | 4 (Dul A)                           | —         | none  |
| 2589 | 526 | His CAC - Arg GAC | —           | none                                | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2597 | —   | none              | —           | none                                | —         | none  |
| 270  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | —           | none                                | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 274  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | —           | none                                | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 276  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | 4           | 4 (Dul A)                           | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2788 | 516 | Asp GAC - Tyr TAC | —           | none                                | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 2791 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | —           | none                                | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 294  | 526 | His CAC - Tyr TAC | —           | none                                | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 310  | 526 | His CAC - Tyr TAC | —           | none                                | 439       | Thr G   |
| 314  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | —           | none                                | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |

Table S2.- Mutational profiles of 99 multidrug resistant isolates. (Continued)

|     |     |                   |         |                                   |           |   |
|-----|-----|-------------------|---------|-----------------------------------|-----------|---|
| 319 | 833 | Leu CTG - Pro CCG | 4       | 4 (Del A)                         | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 32  | 526 | His CAC - Asp GAC | -       | none                              | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 379 | 531 | Ser TCG - Trp TGG | -       | none                              | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 415 | 526 | His CAC - Asp GAC | -       | none                              | -         | none  |
| 433 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | 4 + 115 | 4 (Del A) + 115 (Ins T)           | -         | none  |
| 480 | 526 | His CAC - Ala AAC | 4       | 4 (Del A)                         | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 491 | 516 | Asp GAC - Tyr TAC | 4       | 4 (Del A)                         | 315       | Ser AGC - Thr ACC (2 nucleotides)                 |
| 529 | 526 | His CAC - Tyr TAC | 4       | 4 (Del A)                         | 315       | Asp - Thr ACC                                     |
| 543 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | 4       | 4 (Del A)                         | 315 + 359 | 315 (Ser AGC - Thr ACC) + 359 (Glu GAA - Glu GAG) |
| 563 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | -       | none                              | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 605 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | -       | none                              | 483       | Arg CGG - Leu CTG                                 |
| 640 | 546 | Leu CTG - Pro CCG | 4       | 4 (Del A)                         | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 682 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | -       | none                              | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 711 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | -       | none                              | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 720 | 531 | Ser TCG - Trp TGG | -       | none                              | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 78  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | -       | none                              | -         | none  |
| 790 | 546 | Leu CTG - Pro CCG | 1 + 4   | 1 (Val GTG - Ala GCG) + 4 (Del A) | -         | none  |
| 826 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | -       | none                              | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 836 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | -       | none                              | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 837 | 526 | His CAC - Ala AAC | 4       | 4 (Del A)                         | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 847 | 511 | Leu CTG - Pro CCG | -       | none                              | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 850 | 516 | Asp GAC - Tyr TAC | 4       | 4 (Del A)                         | 315       | Ser AGC - Thr ACC                                 |
| 865 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | -       | none                              | 315 + 425 | 315 (Ser AGC - Thr ACC) + 425 (Del G)             |
| 884 | 526 | His CAC - Tyr TAC | 93      | Ala GCG - Thr ACC                 | -         | none  |
| 885 | -   | none              | -       | none                              | 315       | Ser AGC - Asp AAC                                 |



Table S2: Mutational profiles of 99 multidrug resistant isolates. (Continued)

|     |     |                   |   |         |     |                   |
|-----|-----|-------------------|---|---------|-----|-------------------|
| 886 | 508 | Thr ACC - Phe CCC | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
|     | 508 | His CAC - Tyr TAC | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 89  | 511 | Leu CTG - Phe CCG | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
|     | 531 | Ser TCG - Tyr TGG | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 933 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 96  | 518 | Asp GAC - Val GTC | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
|     | 526 | His CAC - Arg CGC | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 972 | 511 | Leu CTG - Phe CCG | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 976 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | - | 4 (D4A) | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 981 | 531 | Ser TCG - Leu TTG | 4 | 4 (D4A) | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 452 | -   | none              | - | none    | -   | none              |
| 358 | 526 | His CAC - Cys TGC | - | none    | 315 | Ser AGC - Ser AAC |
| 378 | 526 | His CAC - Asp GAC | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 2   | -   | none              | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 155 | -   | none              | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 150 | 526 | His CAC - Asp GAC | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 231 | 526 | His CAC - Asp GAC | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 285 | -   | none              | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 107 | -   | none              | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 3   | 518 | Asp GAC - Tyr TAC | - | 4 (D4A) | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 7   | 471 | Met ATG - Ile ATT | 4 | 4 (D4A) | 315 | Ser AGC - Ile ATC |
|     | 531 | Ser TCG - Leu TTG | - | none    | 315 | none              |
| 11  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 76  | 526 | His CAC - Tyr TAC | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 261 | 526 | His CAC - Asp GAC | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |
| 88  | 531 | Ser TCG - Leu TTG | - | none    | 315 | Ser AGC - Thr AGC |



