



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

Flávia Alvim Dutra de Freitas

Bases moleculares da multiresistência a drogas em *Mycobacterium tuberculosis*

Rio de Janeiro
2009

Flávia Alvim Dutra de Freitas

Bases moleculares da multiresistência a drogas em *Mycobacterium tuberculosis*

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

Orientador: Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano

Rio de Janeiro

2009

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

F867 Freitas, Flávia Alvim Dutra de.
Bases moleculares da multirresistência a drogas em Mycobacterium tuberculosis / Flávia Alvim Dutra de Freitas. – 2009.
106 f.

Orientador: Rodolpho Mattos Albano.

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

1. *Mycobacterium tuberculosis* - Teses. 2. Drogas - Resistência - Teses. 3. Tuberculose - Tratamento - Teses. 4. Mutagênese - Teses. 5. Rifampicina - Teses. 6. Isoniazida - Teses. 7. Pirazinamida - 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 dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Flávia Alvim Dutra de Freitas

Bases moleculares da multiresistência a drogas em *Mycobacterium tuberculosis*

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

Aprovada em 25 de novembro de 2009.

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

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra Ana Maria Rossini Teixeira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro
2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, e ao Centro de Referência Professor Hélio Fraga, da FIOCRUZ, 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, Denise Neves e Daniela Cidade por deixarem a vida mais colorida.

Às amadas amigas: Fernanda Nunes e Nathalia Meireles pela amizade e carinho.

Ao amigo lindo Ivan Ribeiro pela energia boa, calma e otimismo sempre.

Às queridas amigas: Simone, Márcia e Rosana por toda alegria, amizade e companheirismo.

Ao mais novo integrante do Genoma, Júnior, pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica: Tatiana, Davy, Diego, Leozinho, Sheila e Suelen.

Aos amigos: Fátima Fandinho, Paulo e Jesus por todo carinho e colaboração.

Ao Fred, por existir na minha vida.

Ao Helio Ribeiro de Siqueira, sem o qual seria impossível a realização deste trabalho, por todo apoio e carinho.

Ao Zé Mário por estar sempre torcendo e contribuindo para o meu progresso.

Aos amigos queridos: Nina Pamplona, Elisa Firpo, Amandinha (fofa), Letícia, Esther, Thiago, Mari, Daniel, Rafinha, Jan e Gutinha pelo presente mais rico que alguém pode ganhar: a amizade.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original

Albert Einstein

RESUMO

FREITAS, Flavia Alvim Dutra. **Bases moleculares da multiresistência a drogas em *Mycobacterium tuberculosis***. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

A tuberculose (Tb) é a principal causa de morte no mundo, por um agente infeccioso. O tratamento padrão é a quimioterapia: rifampicina (RMP), isoniazida (INH) e pirazinamida (PZA). O maior problema global da Tb é o aumento de cepas multirresistentes (resistência pelo menos à INH e à RMP) do *Mycobacterium tuberculosis* (MTb). A resistência à INH e RMP ocorre geralmente por mutação genética nos genes *KatG* e *rpoB*, respectivamente. Os objetivos deste trabalho foram: 1. Analisar os tipos e freqüências de mutações em duas regiões iniciais do gene *katG* do MTb. 2. Determinar os tipos e freqüências das mutações no gene *rpoB*. Duas regiões do gene *katG* e uma do gene *rpoB* foram amplificadas por PCR e seqüenciadas para o diagnóstico das mutações. Para a análise do gene *katG* foram utilizadas 101 cepas. Dentre estas, 4 eram sensíveis e não apresentaram mutação (controle). Das 97 cepas restantes, na primeira região seqüenciada do *KatG*, não ocorreram mutações em 67. Nas outras 30 cepas houve 33 deleções de nucleotídeos, sendo que 24 ocorreram no último nucleotídeo do códon 4 (24,7%), o que caracterizou um novo alelo. Na região 2, dentre as 97 cepas não houve mutação em 16 - sete estavam associadas a ausência de mutação na região 1. Ocorreram 83 mutações pontuais, sendo 75,3% no códon 315. Sete cepas resistentes a INH não apresentaram mutações em nenhuma das duas regiões analisadas. As mutações na região 2 permitiram o diagnóstico de resistência à INH em 79 cepas ou 81,4%. Nove cepas que não mostraram mutações na região 2 tiveram mutações na região 1. Logo, esta região permitiu o acréscimo do diagnóstico de resistência à INH para 88 cepas, aumentando a positividade em 9,3%. Em sete casos resistentes não houve mutação em ambas as regiões. Na análise do gene *rpoB* usamos 120 cepas de MTb. Nenhuma mutação foi encontrada em 13 isolados resistentes à RMP. O códon que apresentou maior freqüência de mutação foi o 531 (45.6%), seguido pelo 526 (26%) e 516 (12.5%). Em outros onze códons, foi encontrado um total de 18 mutações (15.2%), principalmente nos códons 511 (3.4%) e 513 (3.4%). Nenhum dos isolados sensíveis à RMP apresentou mutações. No Estado do Rio de Janeiro, as mutações mais freqüentes foram: 516 (5%), 526 (2.5 %) e 531 (21.2%). Dentre os outros estados, as mutações mais freqüentes foram: 516 (2.5 %), 526 (11%) e 531 (19.4%). A freqüência de mutações dos isolados do Rio de Janeiro foi comparada com a encontrada nos outros estados, mas quando o removemos da análise, a freqüência de mutações nos códons 531 e 526 para os outros 15 estados é semelhante. A análise estatística mostra que este dado é significativo ($p=0.002$). No entanto, quando todos os estados são analisados simultaneamente, o códon 531 é novamente o mais freqüentemente mutado. A análise do gene *rpoB* diagnosticou a resistência à rifampicina em 89,17% das cepas. Nossos resultados confirmam que, no Brasil, mutações na região RRDR do gene *rpoB* podem prever resistência a RMP.

Palavras-chave: Tuberculose. Rifampicina. Isoniazida. Multirresistencia.

ABSTRACT

FREITAS, Flávia Alvim Dutra. **Molecular bases of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis***. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Tuberculosis (Tb) is the main cause of death in the world due to a infectious pathogenic agent. The standard treatment is chemotherapy: rifampicin (RMP), isoniazid (INH), and pyrazinamide (PZA). One of the most serious global problems is the increase in the occurrence of multidrug resistant *M. tuberculosis* (MTb) strains, resistant to, at least, INH and RMP. Resistance to INH and RMP generally occurs by gene mutations in the *KatG* and *rpoB* genes, respectively. There are two objectives in this thesis: 1- To analyze the type and frequencies of mutations in two different regions of the *katG* gene; 2- To determine the type and frequency of *rpoB* gene mutations. Two regions of the *KatG* gene and one of the *rpoB* gene were amplified by PCR, and sequenced to identify the mutations. For the analysis of the *katG* gene 101 strains were used. Among them, 4 were sensitive and showed no mutation (controls). Among the 97 remaining, in the first sequenced region of the *katG* gene, no mutations occurred in 67. Thirty cases had 33 nucleotide deletions, with 24 deletions at codon 4 (24.7%), which characterized a new allele. In region 2, 16 strains had no mutations - seven were associated with a lack of mutations in region 1. There were also 83 mutations, 73 in codon 315 (75.3%). Seven INH-resistant strains showed no mutations in any of the two regions analyzed. Mutations in region 2 allowed the diagnosis of INH resistance in 79 strains or 81.4%. Nine strains which showed no mutations in region 2 had mutations in region 1. This means that the analysis of this region allowed the increase in INH resistance diagnosis for 88 strains (90.7%), increasing the positive rate in 9.3%. In seven cases, there were no mutations associated with resistance in any of the regions. In the *rpoB* analysis 120 MTb strains were used. No mutations were found in 13 RMP resistant isolates. The codon with the highest mutation frequency was 531 (45.6%), followed by 526 (26%) and 516 (12.5%). In other eleven codons, a total of 18 mutations were found (15.2%), mainly at codons 511 (3.4%) and 513 (3.4%). None of the RMP sensitive isolates showed any mutations. In the State of Rio de Janeiro, the most frequent mutations were: 516 (5%), 526 (2.5%) and 531 (21.2%). Within the other states, the most frequent mutations were: 516 (2.5%), 526 (11%) and 531 (19.4%). The frequency of mutations at codons 516, 526 and 531 from the Rio de Janeiro isolates was compared with those found in other states. When Rio de Janeiro was removed from the analysis, the frequency of mutations at codons 531 and 526 for the other 15 states was similar. The statistical analysis shows that this data is significant ($p = 0.002$). However, when all states were analyzed together, the codon 531 is again the most frequently mutated. The analysis of the *rpoB* gene diagnosed RMP resistance in 89.17% of the strains. Our results confirm that, in Brazil, mutations in the RRDR of the *rpoB* gene are good predictors of RMP resistance.

Keywords: Tuberculosis. Rifampin. Isoniazid. Multidrug resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Número estimado de mortes, por ano, devido à doenças infecciosas, no mundo.....	16
Figura 2 –	Distribuição da tuberculose no mundo no ano de 2003.....	16
Figura 3 –	Prevalência da infecção por HIV no mundo em 2007.....	17
Figura 4 –	Prevalência da tuberculose em países subdesenvolvidos.....	17
Figura 5 –	Distribuição do genótipo Beijing no mundo.....	18
Figura 6 –	DOTS no mundo e no Brasil. Ano 2004.....	20
Figura 7 –	Prevalência da Tuberculose multirresistente no mundo entre os novos casos de tuberculose no período de 1994 a 1999.....	27
Figura 8 –	Multirresistência no Mundo no ano 2000.....	27
Figura 9 –	Estrutura química da isoniazida, da rifampicina, da pirazinamida e do etambutol.....	29
Figura 10 –	Genoma do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31
Figura 11 –	Genoma do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> com exemplo de seqüências de inserção IS6110.....	32
Figura 12 –	Sensibilidade à isoniazida.....	34
Figura 13 –	Resistência à Isoniazida.....	34
Figura 14 –	Mutações no gene <i>rpoB</i> produzem modificação na região de ligação da RNA polimerase com a rifampicina e perda de sua ação.....	36
Figura 15 –	Região determinada de resistência à rifampicina (RRDR) ou Região <i>Hot Spot</i>	37
Figura 16 –	Gel de agarose 0,8% com o DNA de Mtb extraído.....	43
Figura 17 –	Mapa do Brasil mostrando os diferentes estados de coleta e número de isolados analisados para o gene <i>KatG</i>	53
Figura 18 –	Localizações das Mutações Encontradas no gene <i>KatG</i>	56
Figura 19 –	Principais resultados para as 2 regiões do gene <i>KatG</i>	56
Figura 20 –	Mapa do Brasil mostrando os diferentes estados de coleta e número de isolados analisados para o gene <i>rpoB</i>	57
Figura 21 -	Variação do número de mutações nos códons 531, 526 e 516 no estado do Rio de Janeiro, nos outros estados e em todos os estados brasileiros analisados.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Definição dos casos de MR conforme o conceito brasileiro.....	24
Quadro 2 –	Genes do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> que mutados causam resistência aos medicamentos.....	30
Quadro 3 –	Correlação entre os testes de sensibilidade e mutações das 99 cepas.....	51
Quadro 4 –	Cepas com mutações apenas na região 1 do gene <i>KatG</i>	53
Quadro 5 –	Cepas com mutações apenas na região 2 do gene <i>KatG</i>	54
Quadro 6 –	Cepas que apresentaram mutações em ambas as regiões do gene <i>KatG</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Dados demográficos dos pacientes analisados.....	46
Tabela 2 –	Dados demográficos dos pacientes DPOC classificados conforme GOLD 2006.....	48
Tabela 3 –	Dados demográficos dos pacientes DPOC classificados conforme GOLD 2011.....	58
Tabela 4 –	Dados demográficos dos pacientes DPOC classificados a partir da presença de sintomatologia de acordo com a escala MRC	59
Tabela 5 -	Dados demográficos dos pacientes DPOC classificados de acordo com numero de exacerbações no último ano	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISO	<i>International Standards Organization</i>
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
rpm	Rotações por minute
α	Alfa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	38
1.1	Objetivo geral	38
1.2	Objetivos específicos	38
2	MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1	Material permanente	39
2.2	Material de consumo	39
2.3	Reagentes	40
2.4	Métodos	40
2.5	Cepas	41
2.6	Culturas	41
2.7	Teste de sensibilidade / identificação	42
2.8	Extração de DNA das culturas isoladas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	42
2.9	PCR e Sequenciamento	43
2.10	Análise estatística	45
3	RESULTADOS	46
4	DISCUSSÃO	63
4.1	Análise do gene <i>KatG</i>	63
4.2	Análise do gene <i>rpoB</i>	65
4.3	Tuberculose, uma questão social	68
4.4	Considerações sobre estudos epidemiológicos	69
4.5	Tuberculose X – DR	70
	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto - UERJ	84
	ANEXO B - Isoniazid-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strains arising from mutations in two different regions of the <i>katG</i> gene	85

ANEXO C - Evolução clínica de um grupo de pacientes com TB multirresistente atendidos em um centro de referência na cidade do Rio de Janeiro.....	86
ANEXO D - Métodos moleculares no diagnóstico da tuberculose e na resistência do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> às drogas.....	87

INTRODUÇÃO

Considerações gerais e tuberculose no mundo

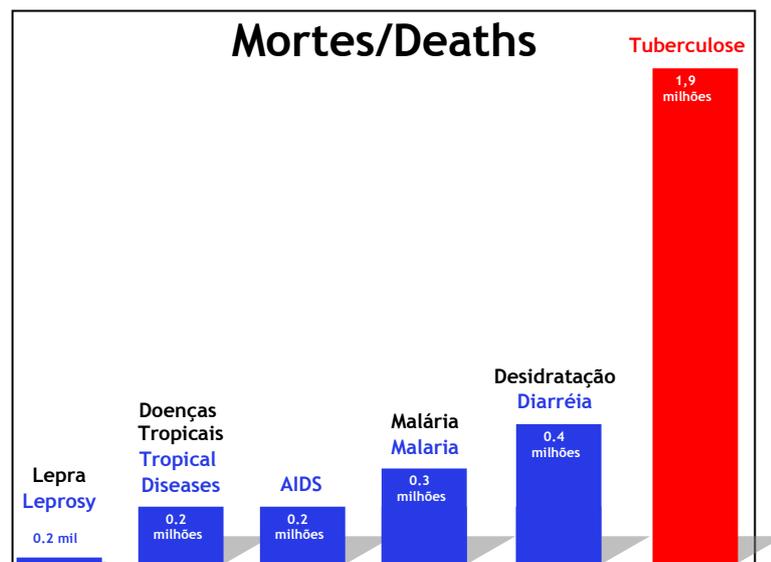
A tuberculose (Tb) é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTb), espécie do gênero *Mycobacterium*. Esta bactéria, também conhecida como bacilo de Koch, tem a forma reta ou ligeiramente curva, sendo imóvel, não esporulada e não encapsulada. O MTb é espécie aeróbia estrita e, por isso, multiplicam-se bastante no pulmão e em cavidades aéreas. Sua reprodução, durando de 14 a 20 horas, é lenta quando comparada com outras bactérias patogênicas, o que explica a lenta evolução da doença bem como a eficácia da medicação, quando bem administrada. A MTb é capaz de diminuir seu metabolismo e sua multiplicação podendo permanecer latente por longo período, o que condiz com os achados clínicos de reativação da doença anos após a primeira infecção (Silveira, 2000).

A Tb, entre as doenças infecciosas causadas por um único microorganismo é a que mais causa óbitos no mundo (Kato-Maeda *et al.*, 2001; Frieden *et al.*, 2003) (Figura 1). Seu agente causal, o MTb, infecta um terço da humanidade e causa 8 milhões de novos casos de Tb por ano, provocando anualmente 1,9 milhão de óbitos. A prevalência da Tb foi estimada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1,8 bilhão de pessoas e aproximadamente 1/3 da população mundial já teve contato com o bacilo (WHO, 2006a). Noventa e cinco por cento dos casos no mundo e 98% dos óbitos ocorrem em países emergentes. Cerca de 80% dos casos da doença acontecem na Ásia e na África (Ducati *et al.*, 2006). Embora os países da Ásia apresentem grandes populações e grandes quantidades de casos de Tb, em valores absolutos, a maior incidência da doença se dá na África, principalmente nos países subsaarianos, onde os casos excedem a 600 por 100.000 habitantes (Corbett *et al.*, 2006; Dye, 2006).

A Figura 2 mostra a incidência da Tb no mundo. A expansão da Tb também é facilitada pela epidemia de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e sua consequência, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Na África, notadamente na África do Sul, onde a incidência de Tb é de 560/100 mil habitantes, a prevalência de casos soro positivos (HIV) é de 18,8% da população (Figura 3)

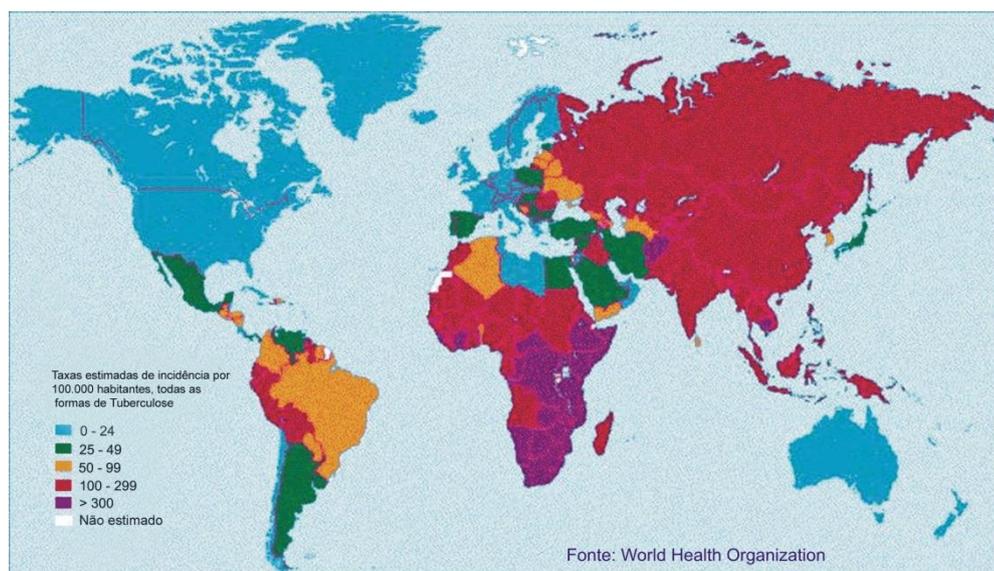
(WHO/UNAIDS, 2007). Assim sendo, ao analisarmos as estimativas de que 20% das pessoas que adquirem Tb no mundo falecem, tais números apontam que em muitos países o sistema de saúde falha ou não tem condições econômicas de dar tratamento aos pacientes (Ruffino-Netto, 2002; Costa Neto, 2007).

Figura 1 - Número estimado de mortes, por ano, devido à doenças infecciosas, no mundo



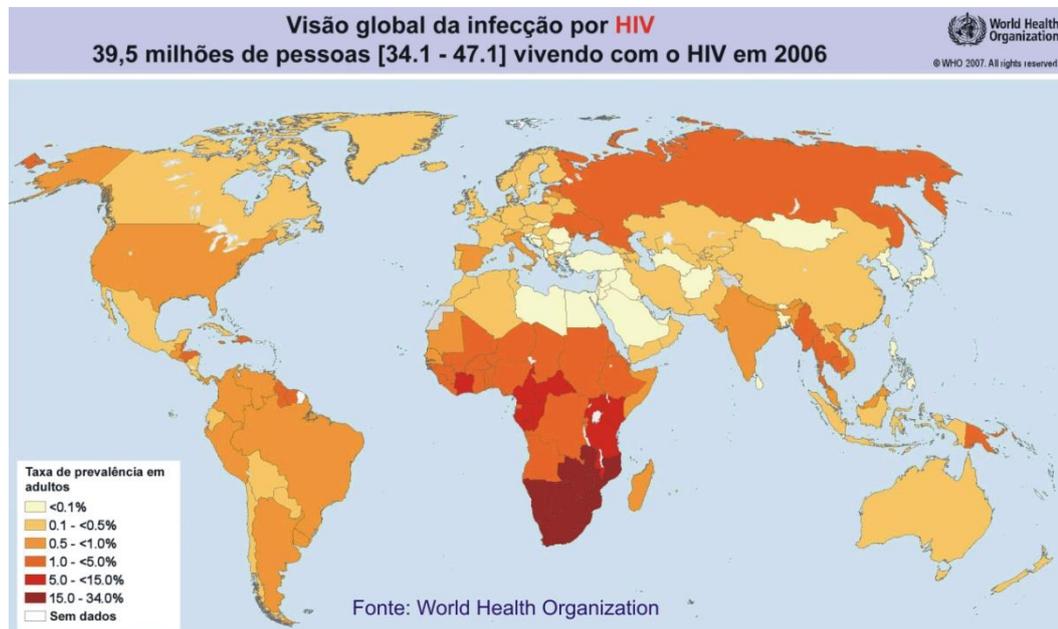
Fonte: Apud *Folder* da Sociedade QTRÓP de Química Fina para o Combate a Doenças Infecciosas.

Figura 2 - Distribuição da tuberculose no mundo no ano de 2003



Fonte: (http://www.who.int/tb/publications/globalreport_2003).

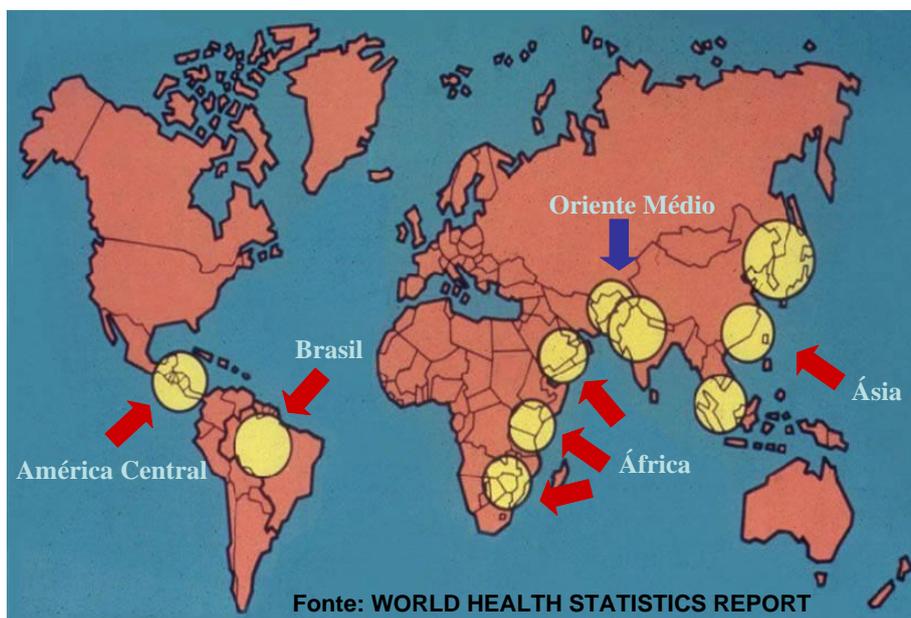
Figura 3 - WHO/UNAIDS. Prevalência da infecção por HIV no mundo



Fonte: (<http://www.who.int/globalatlas/dataquery/default.asp>)

Como a incidência e letalidade da Tb é primariamente influenciada pelas condições sócio-econômicas e pelo desinteresse político, esta doença apresenta alta prevalência em países subdesenvolvidos, que abrigam 95% de todos os casos (Figura 4) (Ruffino Netto, 1997; Rosemberg, 1999; Lauzardo & Ashkin, 2000; WHO, 2003).

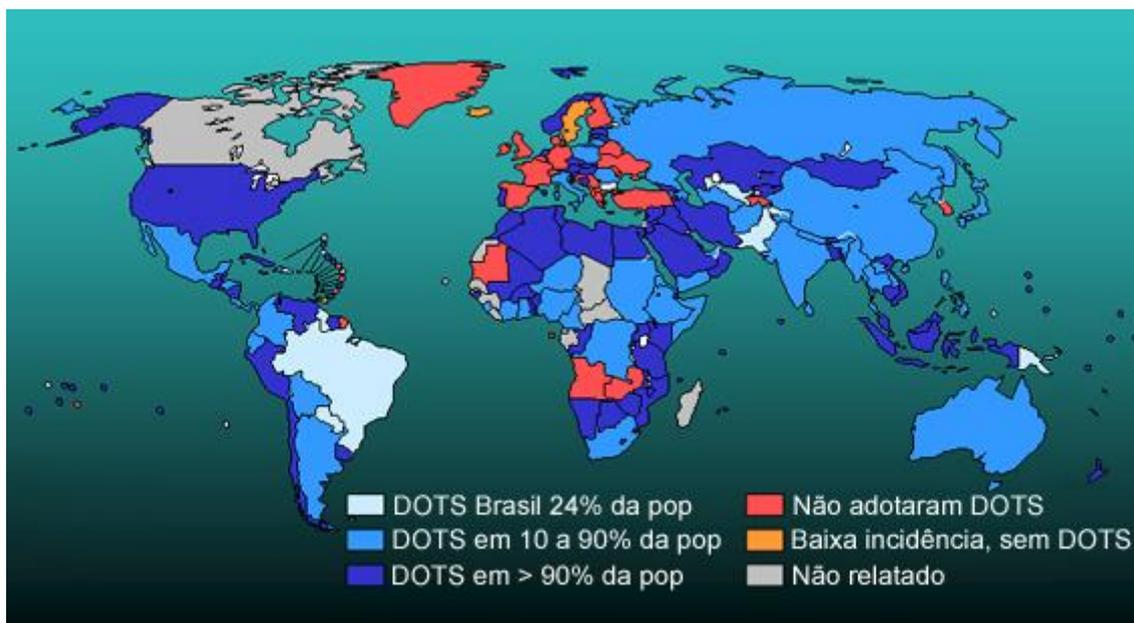
Figura 4 - Ocorrência mundial da tuberculose



Aids a partir de 1986 e a desorganização dos programas de Tb trouxeram consigo o aumento progressivo da incidência da Tb no Brasil e no mundo (MS, 1998; Schluger & Rom, 1998; Kritski *et al.*, 2000; Espinal, 2001). Com o aumento do número de casos de Tb houve, em vários países e regiões, inúmeros casos de microepidemias de tuberculose multirresistente (TbMR), 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).

Em 1993, a OMS declarou quanto à Tb, um *estado de emergência*, e criou o programa “STOP Tb” com o objetivo de reunir instituições de alto nível científico ou de poder econômico para organizar uma luta mais efetiva contra a doença (WHO, 2006b). Neste mesmo ano, 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 Tb e evitar a disseminação da doença (Frieden, 2007). A estratégia tem como objetivos diminuir acentuadamente o abandono do tratamento, a mortalidade por Tb, o surgimento da TbMR, 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 Tb; 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 TbMR (DOT-Plus) (Zumia *et al.*, 2001). Nesta década, grandes regiões críticas no mundo vêm aplicando com sucesso esta estratégia (Figura 6) (Subramani *et al.*, 2008).

Figura 6 - DOTS no mundo e no Brasil. Ano 2004



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

Numa população de MTb que nunca entrou em contato com qualquer medicação para Tb, existem mutantes naturalmente resistentes a drogas tuberculostáticas (Guttmacher *et al.*, 2002). Esta é a chamada resistência natural, que possui uma prevalência baixa. No caso da RMP, por exemplo, ocorrem $3,32 \times 10^{-9}$ mutações por bactéria por divisão celular sendo, portanto, em cada um bilhão de bacilos, 3,32 mutantes resistentes (Gillespie, 2002). Este fato obriga a que se faça o tratamento inicial com pelo menos três drogas, com ações diferentes entre si, para evitar a seleção de bacilos resistentes. Procede-se o tratamento com três drogas com a finalidade de evitar a resistência a uma determinada droga quando esta é usada em monoterapia, por erro de prescrição ou por não adesão do paciente. Devemos ressaltar que o principal mecanismo de resistência do MTb aos fármacos se dá por mutação genética adquirida - resistência adquirida - devida ao tratamento mal realizado ou ao abandono do tratamento. Neste caso, uma mesma cepa bacilar pode desenvolver resistência a um ou mais medicamentos (Espinal *et al.*, 2001a). Por outro lado, chamamos de resistência primária à forma de Tb que se desenvolve em um paciente que se infecta com bacilos já resistentes.

Tuberculose no Brasil e no Rio de Janeiro

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, multirresistência (MR) adquirida de 7,94% (Braga *et al.*, 2003). Neste inquérito não houve distinção de casos HIV positivos que, quando em tratamento hospitalar, adquirem Tb 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 Tb se realiza com quatro drogas – RMP, INH, PZA e etambutol (EMB) (Gillespie, 2002; Timperi *et al.*, 2005).

Em 2006, a OMS priorizou 22 países onde se encontram 80% dos casos estimados de Tb e os classificou em ordem decrescente. O Brasil estava em 15º lugar com 110.000 casos estimados por ano, mas apresentou a menor incidência estimada do grupo – 60/100 mil (Hijjar *et al.*, 2005). Em nosso país, em 2006, ocorreram 78.147 novos casos de Tb, que correspondem à incidência de 41,8/100 mil habitantes, com grandes variações regionais. A mortalidade estimada tem sido de 5.000 casos (Bierrenbach *et al.*, 2007). O Estado de São Paulo tem o maior número absoluto de casos e o Estado do Rio de Janeiro apresenta a maior incidência de Tb do país, com 73,2/100 mil (Hijjar, 2008). Na cidade do Rio de Janeiro este número sobe para 105/100.000, atingindo proporções bem maiores em alguns bolsões de pobreza (Mendes *et al.*, 2007). No Brasil, a prevalência estimada de pacientes com sorologia positiva para o HIV entre os casos novos de Tb em adultos é de 8%. Esta percentagem varia em cada estado, sendo de 20% no Rio Grande do Sul (Siqueira *et al.*, 2005).

A MR sempre causa impacto social, operacional, financeiro e epidemiológico (Rajbhandary *et al.*, 2004). No Brasil, o tratamento inicial com RMP, INH e PZA, tem duração de seis meses e custo para o Ministério da saúde (MS) de menos de cem reais. Entretanto, o tratamento para a TbMR - quando há resistência à RMP, INH e pelo menos a mais um medicamento, EMB, ST ou PZA - tem duração mínima de 18 meses, com menor efetividade, maiores efeitos colaterais e custo superior a quatro

mil dólares (Fortes & Dalcolmo, 1997). O tratamento se faz com a associação dos medicamentos clofazimina, amicacina, terizidona e ofloxacina (Dalcolmo *et al.*, 1999). Em nosso país, no período de 2000 a 2003, foram notificados 1.496 casos com resistência à RMP, INH e, pelo menos, a mais um medicamento acima descrito. Em 96% dos casos a resistência era adquirida, com média de 2,8 tratamentos prévios. A resistência primária foi de 4%. A taxa de resultados favoráveis com o tratamento foi de 61,4%. Houve 242 óbitos (30,2%) e 67 doentes abandonaram o tratamento (8,4%). A freqüência de associação com a infecção pelo HIV foi de 6,8% (98 pacientes) (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2004a).

Características do MTb

O MTb tem características marcantes, diferentes de outras bactérias, que dão vantagens para sua prevalência no mundo. Ele se propaga por via respiratória, na forma de aerossóis contendo partículas infectantes, com um a dois bacilos, que é um meio muito efetivo de disseminação de doença (Kenyon *et al.*, 1996). Os aglomerados humanos – famílias, escolas, favelas, prisões, hospitais e abrigos – favorecem a propagação do bacilo (Mendes *et al.*, 2007; Abrahão *et al.*, 2006; Brito *et al.*, 2004). A imunidade ao bacilo é mediada por células e depende de linfócitos T CD4 e CD8 ativados (Yoshicai, 2006; Woodworth & Behar, 2006). Na lesão, os bacilos em condições de anaerobiose entram em latência, persistem viáveis (bacilos persistentes) e a queda da imunidade pode reativar a doença. A persistência do bacilo na lesão faz com que o tratamento da doença seja prolongado e mantido mesmo quando o paciente já se encontra assintomático (CRFHF, 2002). Se o paciente não for advertido para este fato, cessa a terapia e a doença piora, com a possibilidade de resistência aos medicamentos (Oliveira *et al.*, 2000; Siqueira *et al.*, 2006). A reprodução do bacilo é lenta, ocorrendo a cada 12 a 24 horas. Isto faz com que a doença inicie também lentamente, se desenvolva e, quando atinge o pulmão, freqüentemente a baciloscopia do escarro já é positiva, fechando desta forma o ciclo epidemiológico (CRFHF, 2002). 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 sobrevivência e multiplicação dentro dos lisossomos do macrófago até que este seja ativado pelos linfócitos T CD4⁺ (Yoshikai, 2006).

A imunidade ao bacilo difere para cada pessoa. Apenas 10% dos indivíduos infectados pelo MTb desenvolvem a doença, sendo 5% no primeiro ano e os outros no período restante da vida. Isto mostra que há uma imunidade natural, congênita e variável nas pessoas que pode estar diminuída pela desnutrição, doenças imunológicas, medicamentos imunossupressores, ou mesmo aumentada pela vacinação BCG (CRFHF, 2002). Os doentes com HIV/AIDS apresentam risco de adoecimento por Tb de 5 a 10% a cada ano (Siqueira *et al.*, 2005).

A Tb tem “opção preferencial” pelos pobres que são desnutridos, de baixa escolaridade e que não valorizam adequadamente os cuidados com a saúde (Albuquerque *et al.*, 2001). Por se tratar de doença que acomete preferencialmente a população carente, as verbas para a implementação das políticas de saúde pública são insuficientes. Além disso, por falta de retorno financeiro, os investimentos por parte dos laboratórios farmacêuticos no sentido de desenvolver novos fármacos são pequenos. Esta é a razão porque há 40 anos não surgem novos medicamentos específicos para a Tb (Paolo *et al.*, 2004; Norrby *et al.*, 2005).

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).

Resistência do MTb aos medicamentos

Em nosso país, um inquérito epidemiológico, em nível nacional, do MS, realizado nos anos de 1996-1997, mostrou maior resistência à INH tanto nos casos virgens de tratamento (resistência primária) quanto nos casos de retratamento (resistência adquirida), sendo respectivamente 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). Isto possibilita que o tratamento inicial para a Tb no Brasil seja feito com a associação de três medicamentos – INH, RMP e PZA (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 estreptomina (ST) (Timperi *et al.*, 2005).

Considera-se como definição internacional de multirresistência (MR) a resistência a pelo menos INH e à RMP (Seiscento *et al.*, 1997). No Brasil, como existe o esquema 3 (E-3) - ST, PZA, EMB e etionamida (ET) - padronizado pelo MS e aplicado nos postos de saúde (CRFHF, 2002), define-se como MR a resistência à INH e RMP e a pelo menos mais um dos medicamentos (Quadro 1) (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2004b; Dalcolmo *et al.*, 2007).

Quadro 1 - Definição dos casos de MR conforme o conceito brasileiro

<p>Confirmado:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Resistência à isoniazida e à rifampicina e a pelo menos a mais um terceiro medicamento dos esquemas I e III, independentemente do esquema em uso. • Resistência à isoniazida e à rifampicina, acompanhadas de falência do tratamento com o esquema III. <p>Provável:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Resistência à isoniazida ou à rifampicina e falência bacteriológica comprovada ao esquema III. • Sensibilidade à isoniazida e à rifampicina, porém com falência clínica ou efeitos colaterais importantes e falência do tratamento com o esquema III.

A MR, qualquer que seja o seu tipo, é um fenômeno que não existia antes do tratamento quimioterápico para a Tb. Decorre da irregularidade ou do abandono do tratamento na grande maioria dos casos e, mais raramente, pelo uso inadequado de esquemas terapêuticos de baixa potência, ou por deficiência do sistema de saúde (Natal, 2002). Na resistência primária, o paciente é uma vítima sem culpa, e ela tanto mais ocorre quanto maior o número de doentes com resistência adquirida na população (Teixeira *et al.*, 2001).

Atualmente, em muitos países a prevalência de TbMR 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 Letônia, Rússia, a multirresistência 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; Glynn *et al.*, 2002; Kremer *et al.*, 2004; Kubica *et al.*, 2004; Sajduda *et al.*, 2004), representam uma séria ameaça para o mundo (Zumia *et al.*, 2000, Espinal *et al.*, 2003).

No ano 2000, após padronização de um esquema de tratamento para a MR (conceito brasileiro) pelo MS, o Centro de Referência Prof. Helio Fraga (CRPHF) criou o Programa de Vigilância Epidemiológica da tuberculose multirresistente (TbMR) com a notificação e acompanhamento dos casos, e a organização de um banco de dados nacional. Atualmente, o Sistema de Informação da Tb Multirresistente (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, etambutol (ou pirazinamida), 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 pirazinamida 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 TbMR 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 TbMR 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 TbMR ocorreram no estado do Rio de Janeiro (WHO, 2008a).

Multirresistência no mundo

A multirresistência (conceito internacional) vem aumentando gradativamente no mundo, na ausência de novos e eficientes medicamentos que possam controlá-la, o que tem sido grande causa de preocupação (Espinal *et al.*, 2001; Petrini *et al.*, 1999). Conforme dados da OMS, no ano de 2000 houve 273 mil casos de TbMR 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 Tb). As Figuras 7 e 8 ilustram este aumento. Os países com maior número de casos foram: China, Índia, Tailândia e países da antiga União Soviética, principalmente Cazaquistão e Estônia. China e Índia responderam por, aproximadamente, 50% dos casos do mundo, e a Federação Russa respondeu 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 (WHO, 2008b). O maior número de casos de Tb nestes países vem ocorrendo em imigrantes (Loddenkemper *et al.*, 2002). O problema do aumento da multirresistência está associado à deficiência do sistema público de saúde. O grande exemplo foi a epidemia de TbMR na cidade de Nova York, no final da década de 1980, que aconteceu por falta de financiamento e pelo descontrole dos órgãos públicos, associados ao aumento da pobreza ao número significativo de casos de infecção pelo HIV. A situação só foi revertida com o gasto de um milhão de dólares para a reorganização do sistema de controle e tratamento dos casos (Zumia *et al.*, 2001; Paolo & Nosanchuk, 2004; Frieden *et al.*, 1993).

Figura 7 - Prevalência da Tuberculose multirresistente no mundo entre os novos casos de tuberculose no período de 1994 a 1999

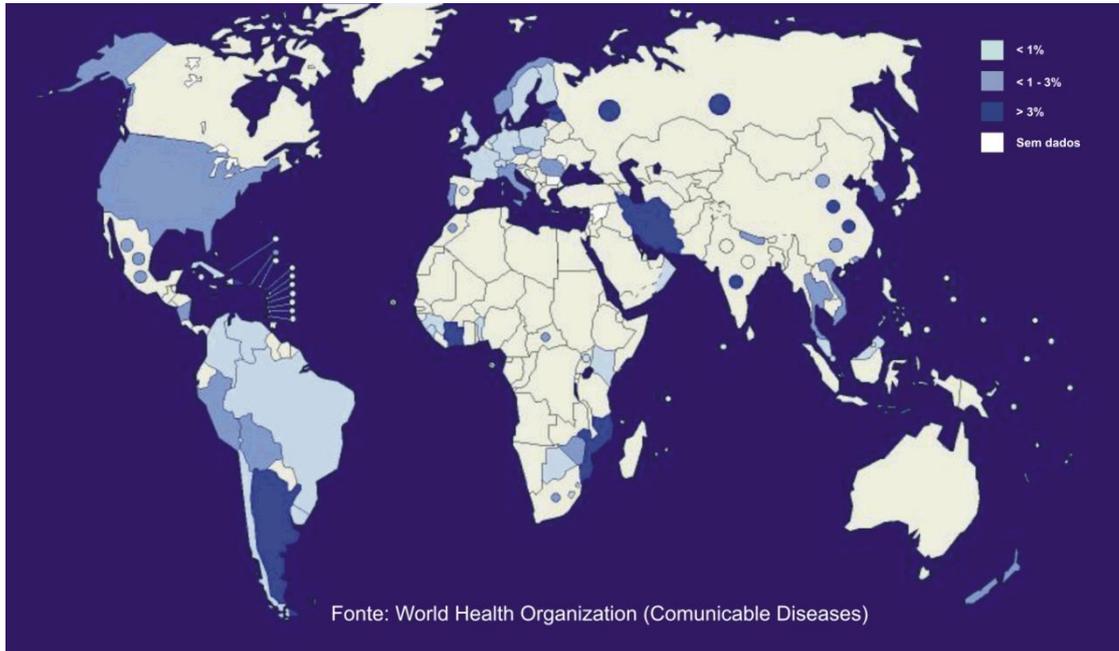
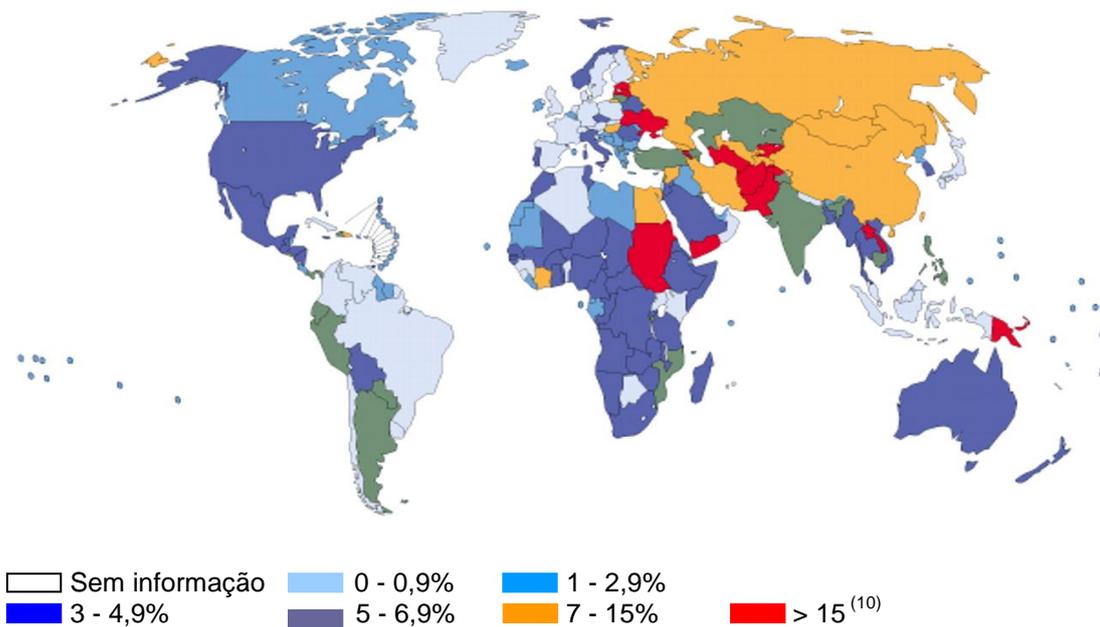


Figura 8 - Multirresistência no Mundo no ano 2000



Fonte: (WHO/HTM/TB/2006.361)

Atualmente, a comunidade científica vem se preocupando com o aparecimento e possível expansão de um tipo de Tb denominado Tb-XDR (*extremely drug-resistant tuberculosis, XDR-Tb*) inicialmente descrito na província de

KwaZulu-Natal, cidade de Tugela Ferry, na África do Sul (WHO, 2007). Este tipo de Tb, resistente à INH, RMP, canamicina e ofloxacina – portanto, de difícil tratamento – vitimou 53 pessoas, com 52 óbitos, em um período de 16 dias, após a coleta inicial de escarro. O teste para HIV foi positivo em 44 pacientes testados (WHO, 2006c). A partir de outubro de 2006, a Tb-XDR passou a ser definida como Tb resistente à INH e RMP, a qualquer fluoroquinolona e a pelo menos mais um dos seguintes medicamentos injetáveis: capreomicina, canamicina ou amicacina (WHO, 2008c).

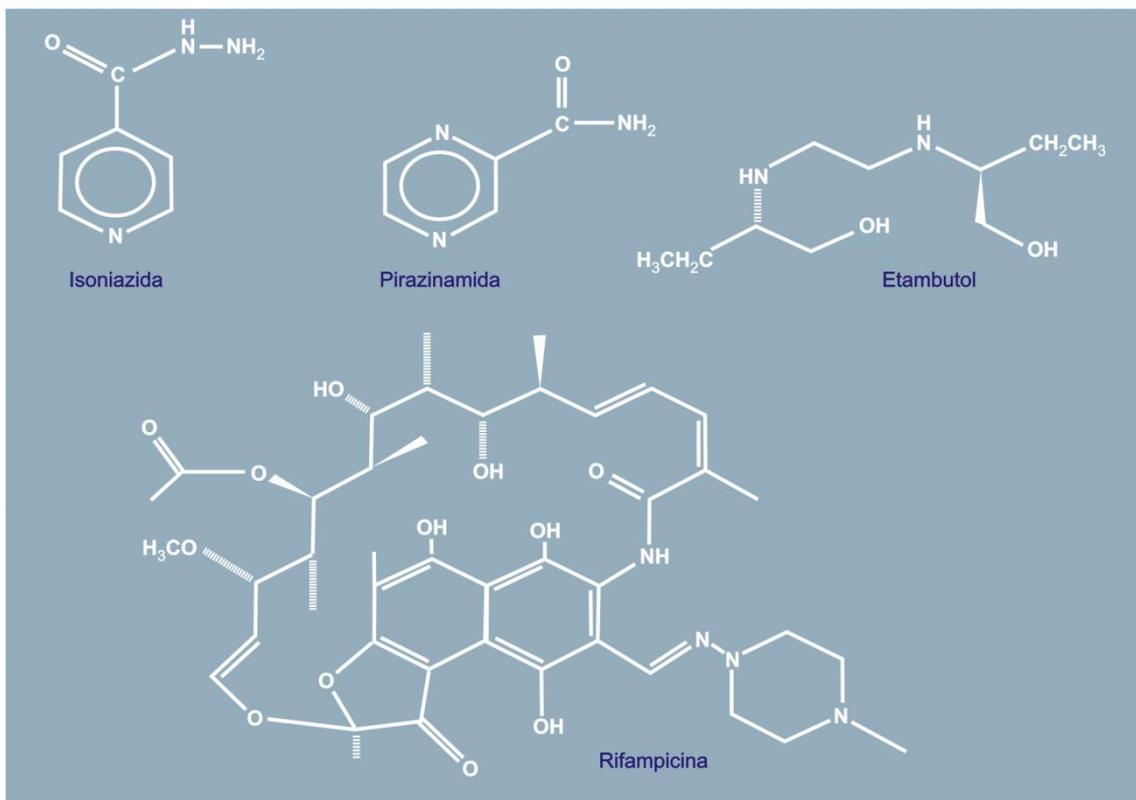
Os números mais significativos de Tb-XDR ocorrem nos países da antiga União Soviética, onde aproximadamente 10% de todos os casos de MR são XDR, variando de 4% na Armênia até a quase 24% na Estônia. Na África do Sul, a proporção de casos XDR entre os casos MR foi de 5,6%. Mas na província de KwaZulu-Natal a proporção foi de 14%, conforme os dados coletados de 2004 a 2007 (Singh *et al.*, 2007). Os casos de Tb-XDR têm sido poucos na Europa central e ocidental, bem como na América (CDC, 2006). A Tb-XDR ocorre pela não aderência dos doentes ao tratamento ou quando estes se infectam com bacilos já resistentes (resistência primária) (Teixeira, 2007). O tratamento destes casos é complexo e muito oneroso. Segundo Zager e McNerney (2008) se considerarmos o número de novos casos de TbMR em termos de população, os países africanos estarão entre as nações de maior incidência desta doença no mundo. Se atentarmos para o fato de que estes países têm alta incidência de casos HIV positivos, passamos a entender porque a Tb-XDR se iniciou em um país africano.

Características químicas da isoniazida e da rifampicina

A isoniazida e a rifampicina são os medicamentos mais eficazes para o tratamento da Tb. Associados à PZA, constituem o esquema E-1 de primeira linha, padronizado pelo MS. A INH tem estrutura simples, constituída de um anel piridina e um grupo hidrazida (Figura 9). É altamente ativa contra o MTb, 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). A RMP é o fármaco mais potente dos medicamentos para Tb. É um antibiótico de largo espectro, com estrutura química complexa (Figura 9) e lipofílica. Esta propriedade

permite uma rápida difusão do fármaco através da parede hidrofóbica do MTb. 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 Tb (Zhang & Telenti, 2000). A concentração inibitória mínima, capaz de matar 99% das bactérias sensíveis, é de 40µg/mL.

Figura 9 - Estrutura química da isoniazida, da rifampicina, da pirazinamida e do etambutol



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

Mutação genética do MTb como causa de MR

O MTb tem a mutação genética como principal mecanismo de resistência para os medicamentos (Telenti, 1998). Como explicado anteriormente, em uma grande população bacteriana há alguns bacilos naturalmente resistentes a determinados medicamentos com os quais nunca entraram em contato, fenômeno que denominamos resistência natural. O uso de monoterapia para tratar tuberculose acaba por selecionar apenas os bacilos resistentes. Este processo só explica a

resistência a um medicamento. A resistência adquirida ocorre sempre que a bactéria permanece um tempo variável em contato com o fármaco em concentração abaixo da concentração inibitória mínima (MIC) e pode surgir para um ou mais medicamentos. A resistência natural não ocorre para dois ou mais medicamentos. Isto porque em uma cavidade pulmonar pode haver até 10^9 bacilos. Neste ambiente, existem bacilos naturalmente resistentes (que nunca entraram em contato com medicamentos) para os diversos fármacos, da grandeza de até 1 em 10^6 bacilos para a INH, 1 em 10^8 para a RMP, 1 para 10^9 para a estreptomicina e 1 para 10^7 para o etambutol. Um bacilo com resistência natural a dois medicamentos (INH e RMP) só poderia surgir se a população bacteriana fosse superior a 10^{14} (Telenti, 1998). Assim, não havia a resistência a dois ou mais medicamentos antes da quimioterapia ter surgido já que decorre de duas ou mais mutações em diferentes genes da mesma bactéria. 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 2 mostra a relação entre medicamentos para a Tb e os genes associados (Zhang *et al.*, 2005).

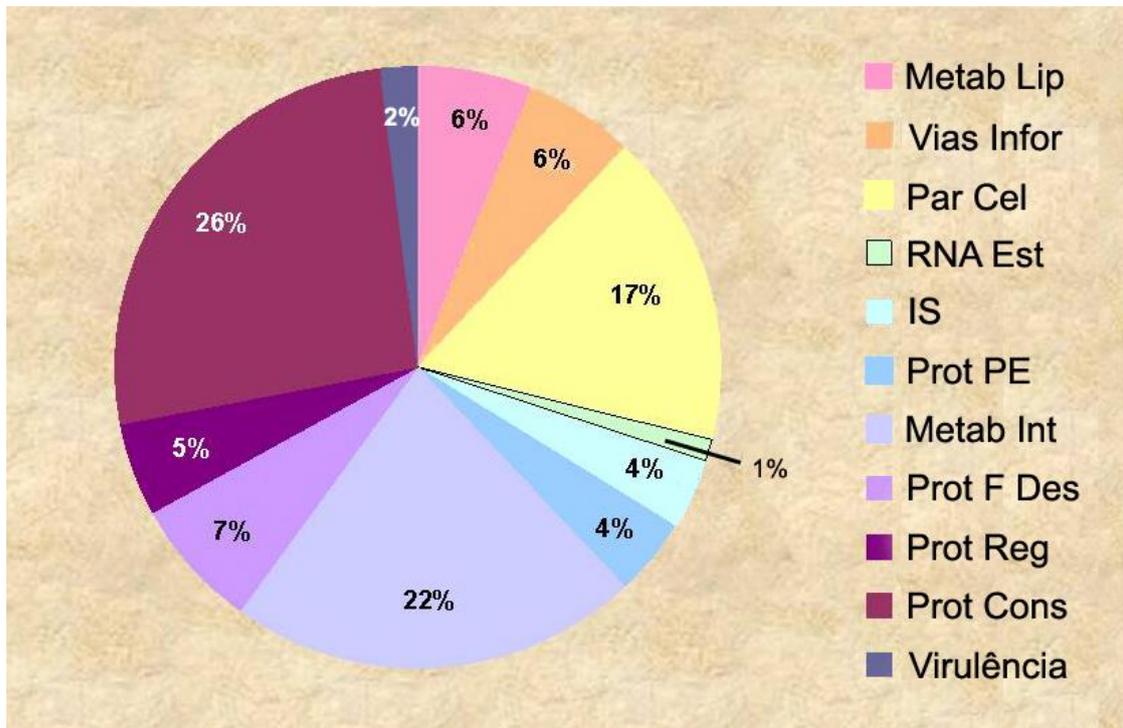
Quadro 2 - Genes do MTb que mutados causam resistência aos medicamentos

Medicamento	Gene envolvido na resistência	Função do gene
Isoniazida	katG	Catalase e peroxidase
	InhA	Enoil ACP redutase
	ndh	NADH desidrogenase
	ahpC	Alquil hidropoxidase
Rifampicina	rpoB	RNA polimerase
Pirazinamida	pncA	Nicotinamidase/pirazinamidase
Etambutol	embCAB	Desconhecida
Estreptomicina	rpsL S12	Proteína ribossomal

O genoma do MTb

O genoma do MTb H37Rv foi completamente seqüenciado em 1998, o que permitiu enorme avanço no conhecimento da biologia do bacilo. O bacilo tem um cromossomo circular com 4.411.532 pares de base e 4.043 genes que codificam 3.993 proteínas e conteúdo G + C de 65.6%. Nenhum plasmídio foi identificado no MTb, 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. Dezesete por cento dos genes do MTb codificam componentes da parede celular. Atualmente, são conhecidas as funções de 2058 proteínas codificadas, o que corresponde a 52% do proteoma. (Figura 10) (Brodin *et al.*, 2005).

Figura 10 - Genoma do *Mycobacterium tuberculosis*

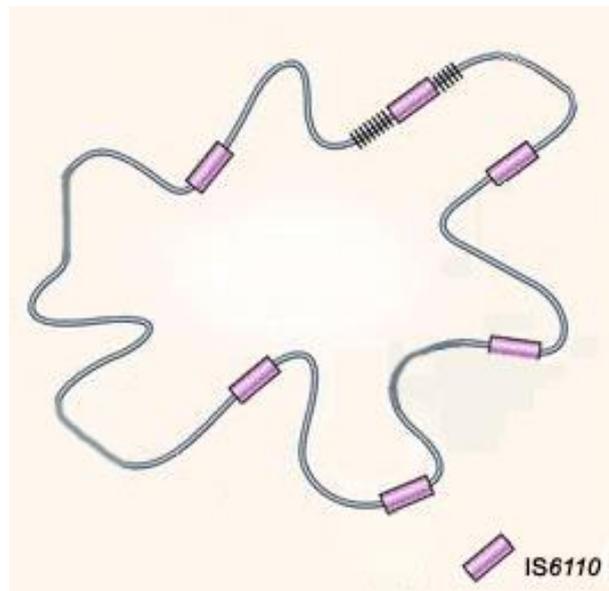


Legenda: Metab Lip – metabolismo lipídico. Vias Infor – vias de informação. Par Cel – parede celular. RNA Est – RNAs estáveis. IS – seqüências de inserção. Prot PE – proteínas PE. Metab Int – metabolismo intermediário. Prot F Desc – proteínas com função desconhecida. Prot Reg – proteínas reguladoras. Prot Cons – proteínas conservadas.

Cerca de 3,0% do genoma é constituído por seqüências de nucleotídeos, denominadas seqüências de inserção (IS), que se repetem com distâncias

semelhantes para cada genótipo (Figura 11). A seqüência IS6110 possui 1.365 nucleotídeos, e é a mais importante, com o número de cópias variando de zero a mais de 25. A caracterização destas inserções é feita por meio de uma enzima de restrição, que corta o DNA em fragmentos de tamanhos variáveis, mas que se repetem nas bactérias com o mesmo genótipo, o que permite o estudo epidemiológico. Esta técnica denomina-se *RFLP* (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição). O genoma do MTb apresenta uma região que contém cópias de seqüências com 36 nucleotídeos que se repetem entre 10 a 50 vezes, denominadas *direct repeat (DR)*. Elas são mais numerosas e mais confiáveis para análise quando as IS são em número menor que cinco. A determinação das *DRs* baseia-se na técnica de PCR com oligonucleotídeos marcados, que é denominada como *spoligotyping (spacer oligonucleotide typing)* (Cave *et al.*, 2005).

Figura 11 - Genoma do *Mycobacterium tuberculosis* com exemplo de seqüências de inserção IS6110



Fonte: Adaptada de Peter *et al.*, 2003.

Mecanismos genéticos de resistência à isoniazida e à rifampicina

O MTb possui várias formas de resistência aos medicamentos. Como todas as bactérias, este tem mecanismos de barreira, como bomba de efluxo e parede

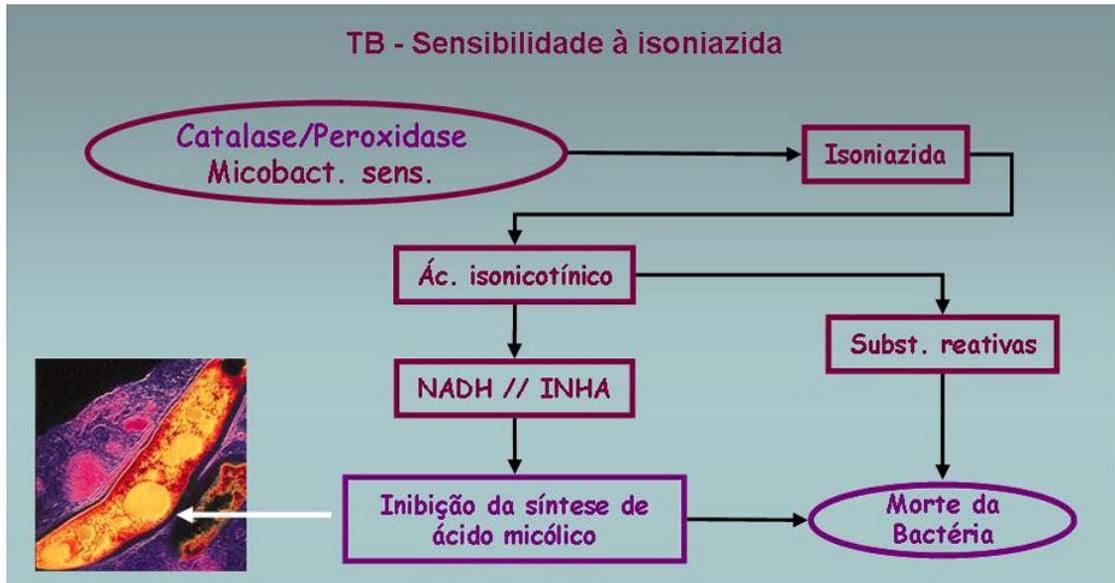
celular protetora, que no gênero *Mycobacterium* é espessa, constituída essencialmente de ácidos micólicos. Esta característica reduz a permeabilidade a inúmeras substâncias, inclusive dando-lhe resistência a ácidos e álcalis fortes, propriedade que permite, no laboratório, o uso destas substâncias para descontaminação de outras bactérias. O MTb produz β -lactamases e outras enzimas modificadoras de medicamentos que lhes dão proteção contra inúmeros antibióticos. Ao contrário de variadas bactérias, em que mecanismos genéticos de resistência aos antibióticos se fazem por troca de plasmídios e transposons, a resistência genética do MTb é essencialmente por mutação. E basta apenas a troca de um par de base que modifique um códon e um aminoácido numa região crítica de um gene para ocorrer resistência.

Isoniazida

Ao contrário da resistência à RMP, na qual a maioria das mutações se concentra em uma pequena faixa 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).

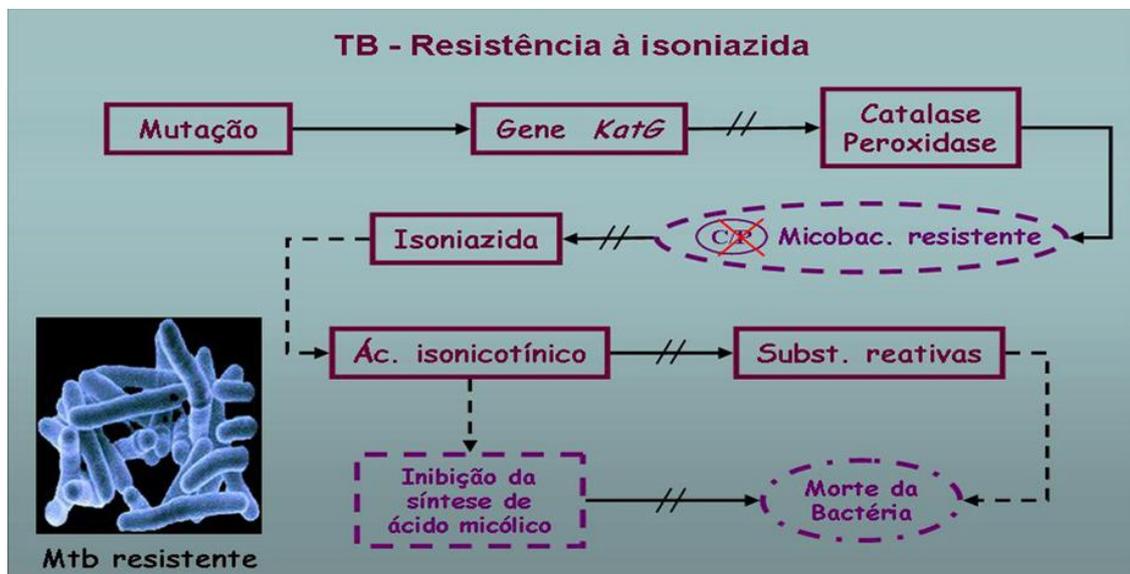
O gene *katG* codifica a enzima catalase-peroxidase, importante no metabolismo do bacilo (Rouse *et al.*, 1996). Esta enzima ativa a INH, que é uma pré-droga (Figura 12 A e B), produzindo radicais reativos de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrato) e radicais orgânicos que inibem 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 ação catalase, o que resulta em resistência à INH (Slayden & Barry, 2000; Pyn *et al.*, 2002).

Figura 12 - Sensibilidade à isoniazida



Legenda: 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.

Figura 13 - Resistência à Isoniazida



Legenda: Mutações no gene *katG* produzem diminuição acentuada da enzima catalase – peroxidase e a não ativação da isoniazida, o que caracteriza a resistência.

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).

Rifampicina

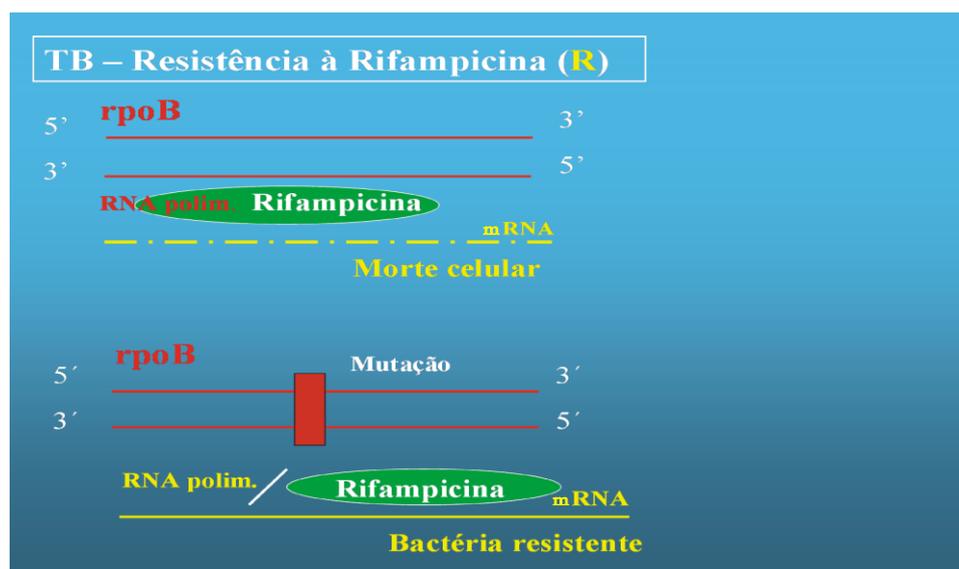
A resistência à RMP é causa importante de falência do tratamento da tuberculose. Além de exercer um potente efeito bactericida inicial sobre os bacilos metabolicamente ativos, esta droga possui excelente efeito esterilizante tardio, agindo sobre bacilos semidormentes. Foi este efeito, aliado à eficácia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

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 (Figura13) (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 pares de base (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 (Figura 14) (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 MTb são importantes para melhor compreensão dos mecanismos de resistência, suas variações regionais e correlações com a doença.

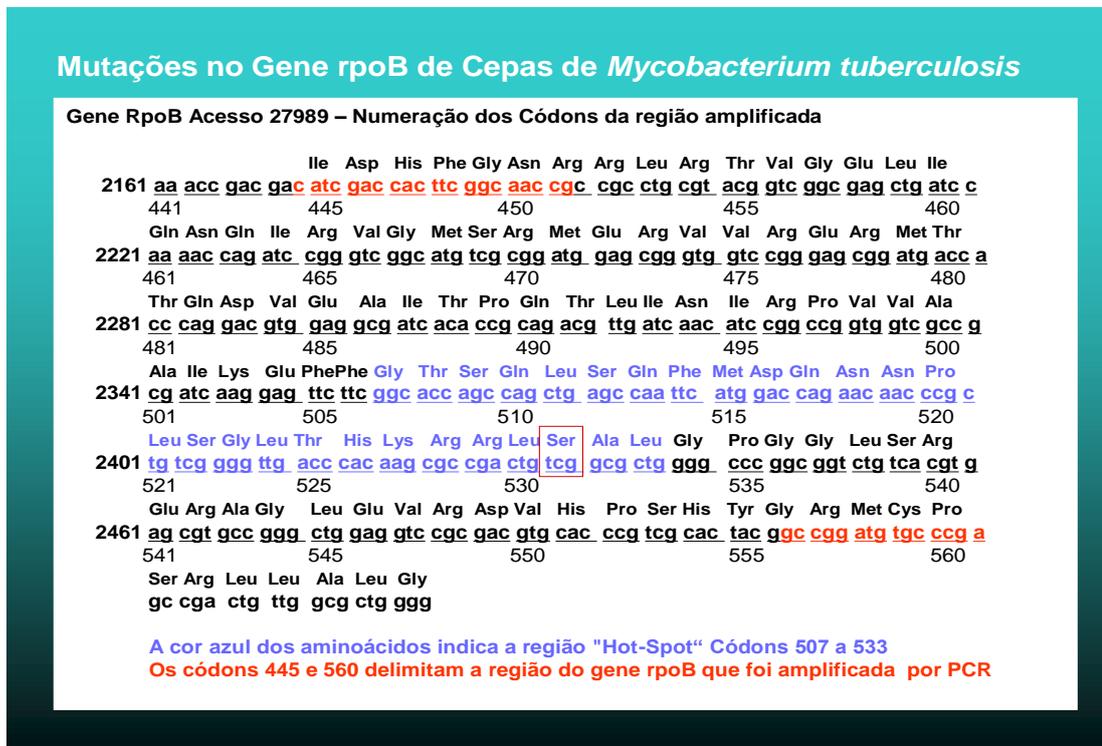
Figura 14 - Mutações no gene *rpoB* produzem modificação na região de ligação da RNA polimerase com a rifampicina e perda de sua ação



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

Figura 15 - Região determinada de resistência à rifampicina (RRDR) ou Região *Hot Spot*



1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Analisar um banco de DNA, constituído de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes provenientes do Centro de Referência Prof. Helio Fraga (FIOCRUZ), para identificar mutações nos genes *katG* e *rpoB* responsáveis pela resistência à INH e à RMP, respectivamente.

1.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a frequência de mutações pontuais, inserções e deleções na região inicial do gene *katG* - ainda pouco estudada - e na região que contém o códon 315 – onde ocorre o maior número de mutações – das cepas do banco de DNA;
- b) Analisar a contribuição de ambas as regiões para o diagnóstico de resistência a isoniazida;
- c) Determinar e comparar o perfil e frequência das mutações do gene *rpoB*, das cepas multirresistentes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material permanente

Os equipamentos utilizados durante este trabalho estão listados a seguir:

- a) Agitador de tubos (Vortex Genie 2 marca Fisher Scientific);
- b) Balanças de precisão e analítica (Precision PR500 e Scientech AS210);
- c) Câmara vertical de fluxo laminar (Quimis);
- d) Câmara fotográfica (Kodak Eletrophoresis Documentation and Analysis System 120);
- e) Cubas para eletroforese horizontal (Horizon 58 marca Life Technologies);
- f) Espectrofotômetro μ Quant da Bio-Tek instruments, inc.;
- g) Fonte de tensão (Amersham Pharmacia Biotech);
- h) Forno microondas (CCE modelo 000305);
- i) Freezer (Electrolux F250);
- j) Geladeira (Electrolux Refrigerador R310);
- k) Macrocentrífuga (Eppendorf modelo Centrifuge 5810 R);
- l) Microcentrífuga (Eppendorf modelo Mini Spin);
- m) Micropipetas automáticas (Eppendorf P10, P20, P100, P200 e P1000);
- n) Seqüenciador automático (MegaBace 1000);
- o) Termocicladores (Eppendorf modelo Mastercycler e Hybaid modelo PCR express);
- p) Transiluminador de luz ultravioleta (modelo TM20 UVP - EUA).

2.2 Material de consumo

- a) Tubo de polipropileno de 1,5 e 0,5 mL (Eppendorf ou similar);
- b) Tubo de polipropileno de 0,2 mL para PCR (Axygen);

- c) Ponteiras universais brancas 20-200 μ L para pipetas automáticas (Axygen);
- d) Ponteiras universais azuis 200-1000 μ L para pipetas automáticas (Axygen);
- e) Papel alumínio, filme de PVC, papel toalha, luvas cirúrgicas;
- f) Placa com fundo V para seqüenciamento automático (Bioscience, marca Sorenson).

2.3 Reagentes

- a) Acetato de amônio (Merck);
- b) Ácido Bórico (GE Healthcare);
- c) Tampão Sódio Borato - SB (Brody and Kern, 2004);
- d) Agarose (GE Healthcare);
- e) Azul de Bromofenol (Merck);
- f) Azul de xileno cianol (Merck);
- g) Brometo de etídio (GIBCO/BRL);
- h) dNTPs (GE Healthcare);
- i) Enzima para PCR, Taq platinum (Invitrogen);
- j) Etanol absoluto (Merck);
- k) Kit específico para o seqüenciador automático MegaBace 1000 (DYEnamic *ET terminator*);
- l) Primers senso e antisenso (Operon).

2.4 Métodos

As culturas de MTb, os experimentos de extração de DNA e testes de sensibilidade para RMP, INH, PZA, EMB e ST foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do Centro de Referência Professor Helio Fraga (FIOCRUZ). Os métodos moleculares 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).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) (Anexo 1).

2.5 Cepas

As cepas de MTb 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 TbMR. 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. Os exames são solicitados, sobretudo quando há suspeita de resistência aos medicamentos do esquema 1 ou 3, ou durante o tratamento para MR.

2.6 Culturas

Foram utilizadas 101 e 120 culturas de MTb para as análises dos genes *katG* e *rpoB*, respectivamente. 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.

2.7 Teste de sensibilidade / identificação

Os testes de sensibilidade foram realizados em meio de cultura LJ, segundo o método das proporções descrito por Canetti *et al.*, 1963 (MS, 1994). As concentrações críticas de RMP e INH empregadas no teste de sensibilidade e as proporções críticas de mutantes resistentes foram respectivamente, para RMP - 40 µg/mL e para INH - 0,2 µg/mL com 99% de confiabilidade para cada (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.

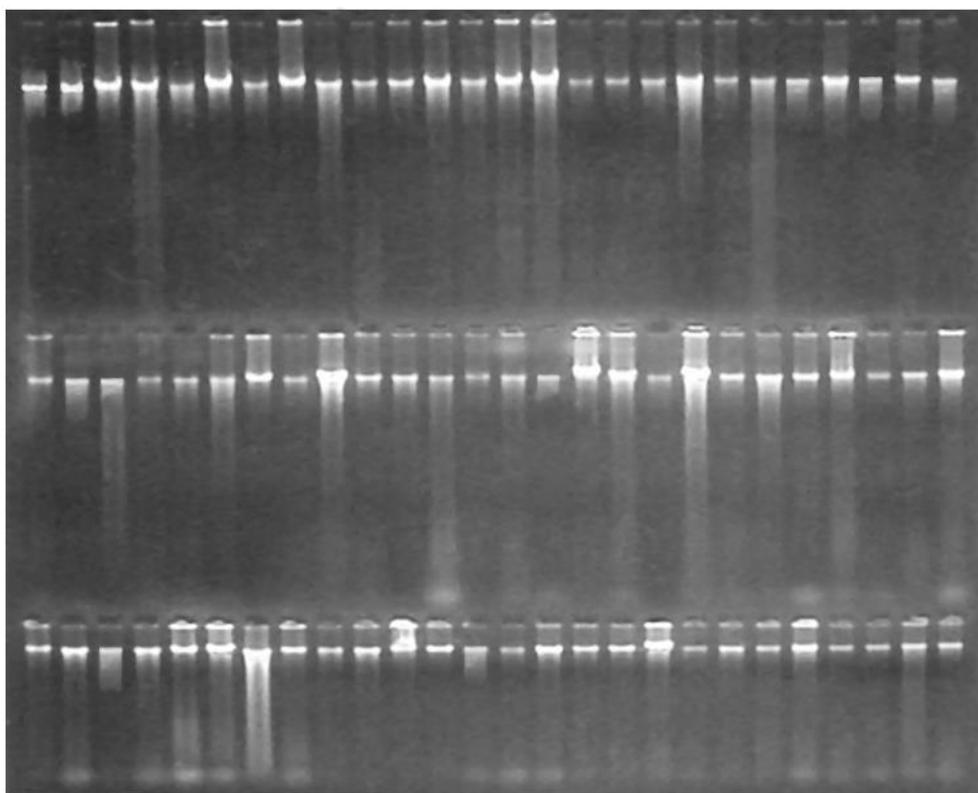
Para a identificação da espécie *M. tuberculosis* foram acrescentados, aos meios de cultura, os agentes inibidores ácido p-nitrobenzóico - PNB e hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico -TCH (MS, 1994).

2.8 Extração do DNA das culturas isoladas de *Mycobacterium tuberculosis*

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 (0,5 mL) 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 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 (no banho-maria). Mantendo as amostras à 65°C, foi adicionado 100 µL da solução de NaCl 5M, 80 µL da solução de CTAB (50 mM). Posteriormente foi feita a incubação à 65°C por 10 minutos (no banho-maria), adicionado 750 µL do clorofórmio e cada tubo foi agitado em vórtex por 30 segundos. O material foi Centrifugado à 14000 rpm por 5 minutos, a fase superior (aquosa) foi transferida para um tubo de 1,5 mL (ao

qual foram previamente adicionados 420 μL de isopropanol) e armazenado à -20°C por pelo menos 30 minutos ou por 18 horas. Posteriormente o DNA foi centrifugado à 14000 rpm por 20 minutos na temperatura de 4°C , o sobrenadante foi retirado, o sedimento lavado com 250 μL de etanol a 75%, centrifugado à 14000 rpm por 5 minutos na temperatura de 4°C , o sobrenadante foi aspirado novamente. Foi necessário deixar os tubos com as tampas abertas por aproximadamente 30 minutos, para a secagem das amostras e foi adicionado 40 μL de tampão TE pH 8,0. Os tubos foram armazenados à -20°C . A figura 15 nos mostra alguns dos DNAs extraídos.

Figura 16 - Gel de agarose 0,8% com o DNA de MTb extraído



Nota: Estão representadas 78 amostras extraídas no Centro de Referência Prof. Helio Fraga.

2.9 PCR e Seqüenciamento

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% (Figura 15), para avaliação qualitativa de integridade e quantificado no espectrofotômetro, 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.

Treze amostras foram seqüenciadas para uma região mais abrangente do gene *rpoB*, compreendendo a região entre os códons 161 e 683 da seqüência com o acesso do genbank explicitado acima. Para isso foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos:

- *rpoB* senso: 5' GGT TCG CCG CGC TGG CGC GAA 3', posição 1260 a 1281.
- *rpoB* senso: 5' CGA GCC GCG GCG CGT GGC 3', posição 1681 a 1698.
- *rpoB* senso: 5' TCT GGT CCG CTT GCA CGA 3', posição 2095 a 2113.
- *rpoB* anti-senso: 5' TCT GGT CCG CTT GCA CGA 3', posição 2095 a 2113.
- *rpoB* anti-senso: 5' GCC GGA TGT GCC CGA TCG 3', posição 2506 a 2523.
- *rpoB* anti-senso: 5' AGA AAG CGG AGT CAT CGA GGA GG', posição 2996 a 2319.

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

- katG1*senso: 5' ACT TCG CGA TCA CAT CCG TG 3', posição 1921 a 1940 da seqüência de número de acesso do genbank U06258.
- katG1*anti: 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:

- katG2*senso: 5' CGG CGG TCA CAC TTT CGG TA 3', posição 2779 a 2798 da seqüência de número de acesso do genbank U06258.
- katG2*anti: 5' CCC GAC TTG TGG CTG CAG GC 3', posição 3471 a 3491 da seqüência de número de acesso do genbank U06258.

Para a reação de amplificação (PCR) seguiu-se um protocolo padrão com a enzima Taq Platinum polimerase, utilizando-se Tampão 10 vezes, dNTP (0,1 Mm), primers senso e anti-senso (50 ng) e o DNA a ser amplificado (40 ng). No termociclador, 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 e 72°C (1min) - extensão, terminando com 72°C por 10min para extensão das fitas. 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.

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.

2.10 Análise estatística

Para as análises dos dados foi utilizado o teste Qui-quadrado no programa GaphPad Prism (GrapPad, EUA), com relação à análise da variável de mutação no gene *rpoB*. Foram utilizados como fatores os estados de origem das amostras, sendo separados dois grupos: as amostras originárias do Estado do Rio de Janeiro e as provenientes dos outros estados.

3 RESULTADOS

A tabela 1 mostra o resultado dos testes de sensibilidade para as amostras utilizadas na análise do gene *KatG*.

Tabela 1 - Teste de sensibilidade e ano de coleta das cepas utilizadas na análise do gene *katG*

Cepas	Ano	Testes de Sensibilidade				
		INH	RMP	PZA	EMB	ST
1	1996	R	R	S	R	R
3	2003	R	R	R	R	R
4	2002	R	R	--	S	R
6	2003	R	R	R	--	R
8	2002	R	R	R	R	R
9	2003	R	R	--	R	S
10	2002	R	R	--	R	S
11	2002	R	R	--	S	S
12	2003	R	R	R	R	R
14	2002	R	R	--	R	S
15	2003	R	R	--	S	R
16	2003	R	R	--	R	R
17	1996	R	R	S	R	R
18	2003	R	R	--	R	--
19	2002	R	R	R	R	R
20	2002	R	R	--	S	R
21	2003	R	R	--	S	S
23	2002	R	R	--	R	S
24	2003	R	R	R	--	--
27	2002	R	R	R	R	S
28	2002	R	R	--	R	S
31	2002	R	R	--	R	R
32	2002	R	R	--	S	S
34	2002	R	R	R	R	S
35	2003	R	R	R	R	S
36	2003	R	R	--	R	R
40	2002	R	R	--	S	S
41	2002	R	R	--	R	S
42	2003	R	R	S	--	--
43	2002	R	R	--	R	S
45	2003	R	R	--	S	S
46	2002	R	R	R	R	R
47	2002	R	R	R	R	R
49	2003	R	R	R	R	R
50	2003	R	R	--	R	R

Continuação da Tabela 1

Cepas	Ano	INH	RPM	PZA	EMB	ST
51	2003	R	R	R	R	S
53	2002	R	R	R	S	S
54	2003	R	R	--	S	R
55	2003	R	R	--	S	S
56	2003	R	R	--	R	R
57	2002	R	R	R	R	R
66	2003	R	R	R	R	R
67	2002	R	R	R	R	R
68	2003	R	R	--	R	R
71	95/97	R	R	S	S	S
72	95/96	R	R	S	S	S
74	95/96	R	R	R	S	S
75	95/96	R	R	S	S	S
76	2003	R	R	S	S	S
77	1997	R	R	R	R	R
78	2003	R	R	R	R	R
79	95/96	R	R	S	S	S
80	95/96	R	R	S	S	S
82	95/96	R	R	S	S	--
85	95/96	R	R	S	S	S
88	2002	R	R	R	R	R
90	2003	R	R	--	R	--
91	2002	R	R	S	R	S
92	2003	R	R	R	R	R
93	2003	R	R	--	R	S
94	95/96	R	R	S	S	S
96	2002	R	R	S	S	S
100	2003	R	R	--	S	S
101	2003	R	R	R	S	S
103	2003	R	R	--	S	S
104	95/96	R	R	S	S	R
105	95/96	R	R	S	S	S
106	2003	R	R	--	R	--
109	2003	S	R	--	R	R
114	95/96	R	R	S	S	S
115	95/96	R	R	S	S	S
117	2003	R	R	--	R	S
118	2003	R	S	--	S	R
123	2003	R	R	--	R	--
125	95/96	R	R	S	S	S
126	2003	R	R	--	R	S
127	2003	R	R	R	R	S
128	2003	S	S	S	--	--
130	2002	R	R	--	--	S
131	2003	R	R	--	S	S

Continuação da Tabela 1

Cepas	Ano	INH	RMP	PZA	EMB	ST
134	95/97	R	R	R	S	S
135	2002	R	R	--	S	S
136	2003	R	R	R	R	S
139	2003	R	R	--	R	R
141	2003	R	R	--	R	R
143	97	R	R	S	S	R
144	2003	R	R	S	-	-
146	2003	R	R	--	S	--
147	2003	R	R	--	S	S
148	2003	R	R	--	R	S
149	2002	R	R	--	R	S
152	95/97	R	R	S	S	S
153	2003	S	...	S	S	S
154	2003	R	R	R	R	R
156	2003	R	R	--	R	S
157	2003	R	R	--	S	S
158	2003	R	R	--	S	--
159	2003	R	R	R	S	S
160	2003	R	R	--	S	S
171	2003	R	S	--	R	S
180	2002	S	R	--	S	S

101 Cepas

S – sensível à isoniazida e ausência de mutação no gene *katG*

R – resistente, -- Ausência de dados

A tabela 2 mostra o resultado dos testes de sensibilidade para as amostras utilizadas na análise do gene *rpoB*.

Tabela 2 - Teste de sensibilidade e ano de coleta das cepas utilizadas na análise do gene *rpoB*

Cepas	Ano	Testes de Sensibilidade					ESTADOS	S/ MUT S
		INH	RMP	PZA	EMB	ST		
1	1996	R	R	S	R	R	A	
2	2003	R	R	--	R	S	RJ	
3	2003	R	R	R	R	R	RJ	
4	2002	R	R	--	S	R	RJ	
5	2003	R	R	--	R	S	A	
6	2003	R	R	R	--	R	RJ	
7	2002	R	R	--	R	R	A	
8	2002	R	R	R	R	R	RJ	
9	2003	R	R	--	R	S	A	
10	2002	R	R	--	R	S	A	
11	2002	R	R	--	S	S	RJ	
12	2003	R	R	R	R	R	RJ	
13	2002	R	R	--	S	S	A	

Continuação da tabela 2.

Cepas	Ano	INH	RMP	PZA	EMB	ST	ESTADOS	S/ MUT S
14	2002	R	R	--	R	S	A	
15	2003	R	R	--	S	R	RJ	
16	2003	R	R	--	R	R	A	
17	1996	R	R	S	R	R	A	
18	2003	R	R	--	R	--	RJ	
19	2002	R	R	R	R	R	RJ	
20	2002	R	R	--	S	R	A	
21	2003	R	R	--	S	S	RJ	
22	2003	R	R	--	--	R	RJ	
23	2002	R	R	--	R	S	A	
24	2003	R	R	R	--	--	RJ	
28	2002	R	R	--	R	S	A	
29	2002	R	R	--	R	R	A	
31	2002	R	R	--	R	R	RJ	
32	2002	R	R	--	S	S	A	
34	2002	R	R	R	R	S	RJ	
35	2003	R	R	R	R	S	RJ	
36	2003	R	R	--	R	R	A	
38	2003	R	R	--	R	R	A	
39	2003	R	R	--	S	S	A	
40	2002	R	R	--	S	S	A	
41	2002	R	R	--	R	S	A	
42	2003	R	R	S	--	--	RJ	
43	2002	R	R	--	R	S	A	
45	2003	R	R	--	S	S	A	
46	2002	R	R	R	R	R	RJ	
47	2002	R	R	R	R	R	RJ	
49	2003	R	R	R	R	R	A	
50	2003	R	R	--	R	R	RJ	
51	2003	R	R	R	R	S	A	
53	2002	R	R	R	S	S	RJ	
54	2003	R	R	--	S	R	RJ	
55	2003	R	R	S	S	RJ	
56	2003	R	R	--	R	R	A	
57	2002	R	R	R	R	R	RJ	
58	2003	R	S	S	S	A	S/ MUT S
59	2003	R	R	--	R	R	A	
61	2003	R	R	--	R	R	A	
63	2003	R	R	--	S	S	RJ	
64	2003	R	R	--	R	S	RJ	
67	2002	R	R	R	R	R	RJ	
68	2003	R	R	--	R	R	RJ	
69	95/96	R	R	S	S	S	B	
70	95/96	R	R	S	S	S	B	
71	95/97	R	R	S	S	S	B	
72	95/96	R	R	S	S	S	B	
73	95/96	R	R	R	S	S	B	
74	95/96	R	R	R	S	S	RJ	
75	95/96	R	R	S	S	S	B	
77	1997	R	R	R	R	R	RJ	

Continuação da tabela 2.

Cepas	Ano	INH	RMP	PZA	EMB	ST	ESTADOS	S/ MUT S
78	2003	R	R	R	R	R	RJ	
79	95/96	R	R	S	S	S	B	
80	95/96	R	R	S	S	S	B	
81	95/96	R	R	R	S	R	B	
82	95/96	R	R	S	S	--	B	
83	95/96	R	R	S	S	S	B	
84	95/96	R	R	S	S	S	B	
85	95/96	R	R	S	S	S	B	
86	95/96	R	R	S	S	R	B	
88	2002	R	R	R	R	R	RJ	
89	2003	R	R	--	S	R	RJ	
90	2003	R	R	--	R	--	RJ	
91	2002	R	R	S	R	S	RJ	
92	2003	R	R	R	R	R	RJ	
93	2003	R	R	--	R	S	RJ	
94	95/96	R	R	S	S	S	B	
95	95/96	R	R	R	S	R	B	
100	2003	R	R	--	S	S	RJ	
101	2003	R	R	R	S	S	RJ	
103	2003	R	R	--	S	S	RJ	
104	95/96	R	R	S	S	R	B	
105	95/96	R	R	S	S	S	B	
106	2003	R	R	--	R	--	RJ	
109	2003	S	R	--	R	R	RJ	
114	95/96	R	R	S	S	S	B	
115	95/96	R	R	S	S	S	B	
117	2003	R	R	--	R	S	RJ	
118	2003	R	S	--	S	R	RJ	S/ MUT S
122	2003	R	R	--	R	--	A	
123	2003	R	R	--	R	--	RJ	
124	95/96	R	R	S	S	S	B	
125	95/96	R	R	S	S	S	B	
126	2003	R	R	--	R	S	RJ	
127	2003	R	R	R	R	S	RJ	
128	2003	S	S	S	--	--	RJ	S/ MUT S
130	2002	R	R	--	--	S	A	
131	2003	R	R	--	S	S	RJ	
134	95/97	R	R	R	S	S	RJ	
135	2002	R	R	--	S	S	A	
136	2003	R	R	R	R	S	RJ	
139	2003	R	R	--	R	R	RJ	
141	2003	R	R	--	R	R	A	
142	2003	R	R	--	R	S	A	
143	95/97	R	R	S	S	R	B	
144	2003	R	R	S	--	--	RJ	
148	2003	R	R	...	R	S	A	
152	95/97	R	R	S	S	S	B	
156	2003	R	R	--	R	S	RJ	
157	2003	R	R	--	S	S	RJ	
158	2003	R	R	--	S	--	RJ	
159	2003	R	R	R	S	S	RJ	

Continuação da tabela 2.

Cepas	Ano	INH	RMP	PZA	EMB	ST	ESTADOS	S/ MUT S
160	2003	R	R	--	S	S	RJ	
161	2002	R	R	R	R	R	RJ	
162	2003	S	S	...	S	S	RJ	S/ MUT S
163	2002	S	S	S	S	S	RJ	S/ MUT S
164	2003	S	S	S	S	S	RJ	S/ MUT S
166	2002	S	S	S	S	S	RJ	S/ MUT S
168	2002	R	R	R	R	R	A	
171	2003	R	S	--	R	S	RJ	S/ MUT S
172	2003	R	R	--	S	S	A	
173	2002	R	R	--	--	--	RJ	
174	2003	R	R	--	R	S	A	
175	2003	R	R	--	R	R	A	
176	2003	R	R	--	S	S	A	
177	2002	R	R	R	R	S	A	

120 Cepas

RJ - Cepas do Estado do Rio de Janeiro: 65 - 7 S/MUT S = 58

A - Cepas de outros estados: 39 - 1 S/ MUT S= 38

B - Cepas do Inquérito de Multirresistência = 24

S/MUT S - cepas com sensibilidade à RMP e sem mutação

Ano: ano de coleta do material para cultura

Dentre as 101 cepas analisadas para o gene *KatG*, 11 não apresentaram mutação em qualquer das duas regiões estudadas. Destas, duas, provenientes da OMS, eram sensíveis à INH (e à RMP). No total, quatro culturas sensíveis à INH não apresentaram mutação nas duas regiões analisadas. No quadro 3 podemos diferenciá-las dos casos em que ocorreram ausência de mutação nas duas regiões e teste de sensibilidade com resistência à INH (7 casos).

O Quadro 3 mostra ainda os resultados dos testes de sensibilidade para INH e RMP de 88 cepas que tiveram mutações em pelo menos uma das regiões do gene *katG* – o que correlaciona as mutações a resistência à INH (as duas cepas com o alelo 463 não foram consideradas). São apresentados também os mesmos testes de sensibilidade relacionados com as 11 cepas que tiveram ausência de mutações em ambas as regiões. Em quatro destes casos havia sensibilidade à INH (casos usados como controle) e os sete restantes apresentavam resistência.

Quadro 3 - Correlação entre os testes de sensibilidade e mutações das 99 cepas**

T S	Mutações	Sem mutações em ambas regiões
INH(R) RMP(R)#	21 (21,2%)	4 (4%)
INH(R) RMP(R) ##	59 (59,6%)	2 (2%)
INH(R) RMP(R) ###	7 (7%)	-
INH(R) RMP(S)	1 (1%)	1 (1%)
INH(S) RMP(R)	-	2 (2%)
INH(S) RMP(S)###	-	2 (2%)
Total	88 (88,9%)	11 (11,1%)

TS – teste de sensibilidade.

R - resistência

S - sensibilidade

Resistência somente à INH e à RMP

Resistência, pelo menos a um dos seguintes medicamentos: estreptomicina (S), etambutol (E) ou pirazinamida (Z).

Ausência de informação pelo menos para um dos seguintes medicamentos: S, E, Z . Ausência de resistência para os demais.

** As duas cepas sem mutação na região 1 e com polimorfismo na região 2 (códon 463) foram retiradas da tabela. Ambas eram INH(R) RMP(R)

A Figura 16 exibe o mapa do Brasil com a distribuição das cepas analisadas para o gene *KatG* para os diversos estados. O Estado do Rio de Janeiro está representado por maior número de isolados (62) devido à sua incidência de Tb e MR ser a mais alta do país. Os outros 39 isolados encontram-se distribuídos pelos outros estados, cobrindo a maior parte do território brasileiro.

Figura 17 - Mapa do Brasil mostrando os diferentes estados de coleta e número de isolados analisados para o gene *KatG*



Legenda: Duas das 3 cepas de GO são provenientes do DF. Estados: AM – Amazonas; PA – Pará; MA – Maranhão; CE – Ceará; PB – Paraíba; PE – Pernambuco; BA – Bahia; GO – Goiás; MG – Minas Gerais; ES – Espírito Santo; RJ – Rio de Janeiro; SP – São Paulo; PR – Paraná.

Os quadros 4, 5 e 6 mostram as cepas com mutações apenas na região 1, apenas na região 2 do gene *KatG* e em ambas as regiões respectivamente.

Quadro 4 - Cepas com mutações apenas na região 1 do gene *KatG*

Códon Mutado	Nº de Cepas
Deleção no CD 107	2
CD 93 – Ala p/ Thr (ACC)	1
Deleção no CD 4 + Deleção no CD 65	1
Deleção no CD 4 + CD 1 Val p/ Ala (GCG)	1
Deleção no CD 67	1
Deleção no CD 79	1

Deleção no CD 4	2
TOTAL	9

CD- Códon

Quadro 5 - Cepas com mutações apenas na região 2 do gene *KatG*

Códon Mutado	Nº de Cepas
CD 315 – Ser p/ Thr (ACC)	43
CD 315 – Ser p/ Asn (AAC)	5
Inserção no CD 439	2
CD 463 – Arg p/ Leu (CTG) #	2
CD 315 – Ser p/ Thr (ACC) + deleção no CD 493	1
CD 315 – Ser p/ Thr (ACA)	1
CD 315 – Ser p/ Ile (ATC)	1
CD 315 – Ser p/ Thr (ACC) + CD 399 Glu (GAA) p/ Glu (GAG) ##	1
CD 315 – Ser p/ Thr (ACC) + CD 463 Arg p/ Leu (CTG)	1
CD 336 – Leu p/ Pro (CCG)	1
CD 439 Gln p/ TAG ###	1
CD 315 – Ser p/ Thr (ACC) + deleção no CD 485	1
TOTAL	60

Polimorfismo. ## Mutação silenciosa. ### Stop códon. CD- Códon

Quadro 6 - Cepas que apresentaram mutações em ambas as regiões do gene *KatG*

Região 1 – Códon Mutado	Região 2 – Códon Mutado	Nº de Cepas
Deleção no CD 4	CD 315 – Ser p/ Thr (ACC)	12
Deleção no CD 4	CD 315 – Ser p/ Asn (AAC)	2
Deleção no CD 4	CD 315 – Ser p/ Thr (ACA)	1
Deleção no CD 4	CD 328 – Trp p/ Arg (CGG) + Inserção no CD 439	1
Deleção no CD 4	CD 315 – Ser p/ Thr (ACC) + CD 463 Arg p/ Leu (CTG) #	1
Deleção no CD 4	CD 315 – Ser p/ Thr (ACC) + CD 399 Glu (GAA) p/ Glu (GAG) ##	1
Deleção no CD 4 + Deleção no CD 26 + Deleção no CD 65	CD 315 – Ser p/ Thr (ACC)	1
Deleção no CD 4 + Deleção no CD 2 + Deleção no CD 11	CD 412 – Trp p/ Cys (TGC)	1
CD 17 – Ser p/ Thr (ACC) + Inserção entre CD 92 e 93	CD 315 – Ser p/ Thr (ACA)	1
TOTAL		21

Polomorfismo. ## Mutação silenciosa. CD- Códon

Através destes três quadros (4,5 e 6), podemos observar as mutações (mutações pontuais, inserções e deleções) e a ausência das mesmas, que ocorreram concomitantemente nas regiões 1 e 2. Com exceção de mutações no códon 486 e mutações silenciosas, qualquer outro tipo de mutação, em uma ou ambas as regiões, sempre produz resistência à INH. Na região 1 não ocorreram

mutações, em 71 cepas. Nas outras 30 cepas houve 33 deleções de nucleotídeos, sendo que a deleção do último nucleotídeo do códon 4 esteve presente 20 vezes, separadamente, e quatro vezes, em associação com outras mutações. Apenas uma inserção e três mutações pontuais foram registradas. Na região 2, das 101 cepas, não houve mutação em 20 - onze estavam associadas a ausência de mutação na região 1. Ocorreram três mutações isoladas no códon 463, de Arginina (CGG) para Leucina (CTG). Este alelo não causa resistência à INH e é considerado apenas como um polimorfismo (Hijjar, 2008). Nas outras 79 cepas houve duas deleções, três inserções e 83 mutações pontuais, sendo 73 no códon 315 (72,2% dos 101 casos). A mutação Serina (AGC) para Treonina (ACC) ocorreu 61 vezes (56 vezes como forma isolada, enquanto em seis vezes estava associada a mutações em outros códons). A mutação Serina (AGC) para Asparagina (AAC) aconteceu sete vezes, para Treonina (ACA) três e para Isoleucina (ATC) uma vez. Nesta mesma região houve uma mutação silenciosa no códon 399, de Ácido glutâmico (GAA) para Ácido glutâmico (GAG), associada à outra mutação, responsável pela resistência à INH. Em mais duas cepas surgiu uma mutação no códon 463, mas associada à mutação do códon 315. A mutação no códon 439, de Glutamina (CAG) para (TAG) codifica um códon de parada de síntese de RNA (stop códon). As mutações da região 2 permitiram o diagnóstico de resistência à INH em 79 cepas ou 78,2% dos 101 casos. Nove cepas que não mostraram mutações na região 2 tiveram mutações na região 1 (Quadro 4). Isto significa que esta região permitiu o acréscimo do diagnóstico de resistência à INH para 88 cepas (87,1% das 101 cepas) o que aumentou a positividade em 8,9%. Um resumo das localizações das mutações encontradas para as duas regiões do gene *KatG* é apresentado na Figura 17, com seus principais resultados explicitados na Figura 18.

Figura 18 - Localizações das Mutações Encontradas no gene *KatG*

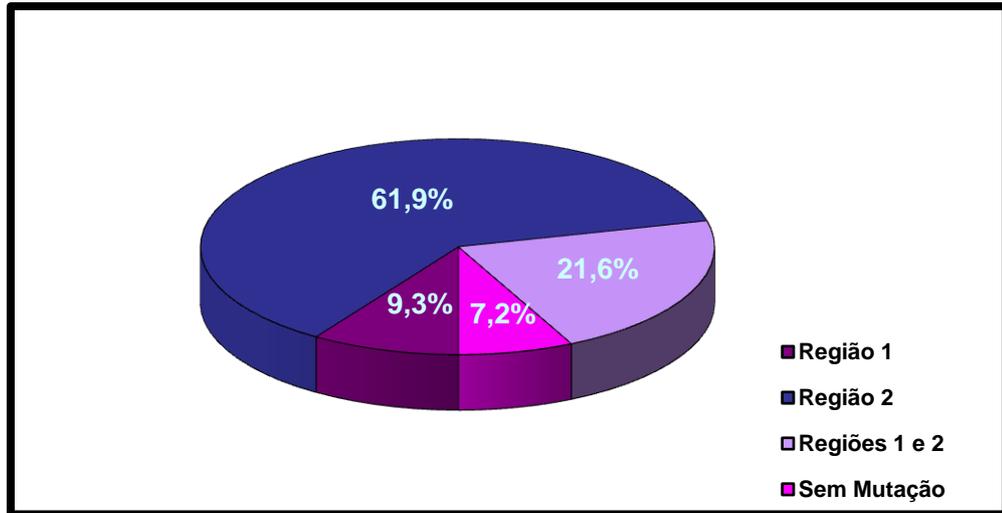
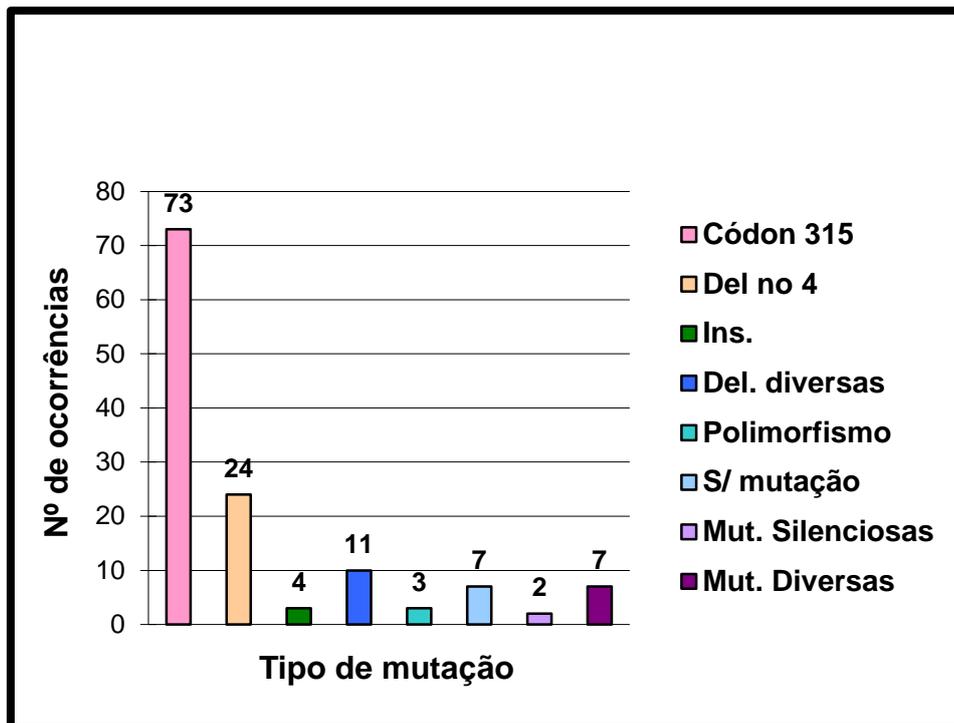


Figura 19 - Principais resultados para as duas regiões do gene *KatG*

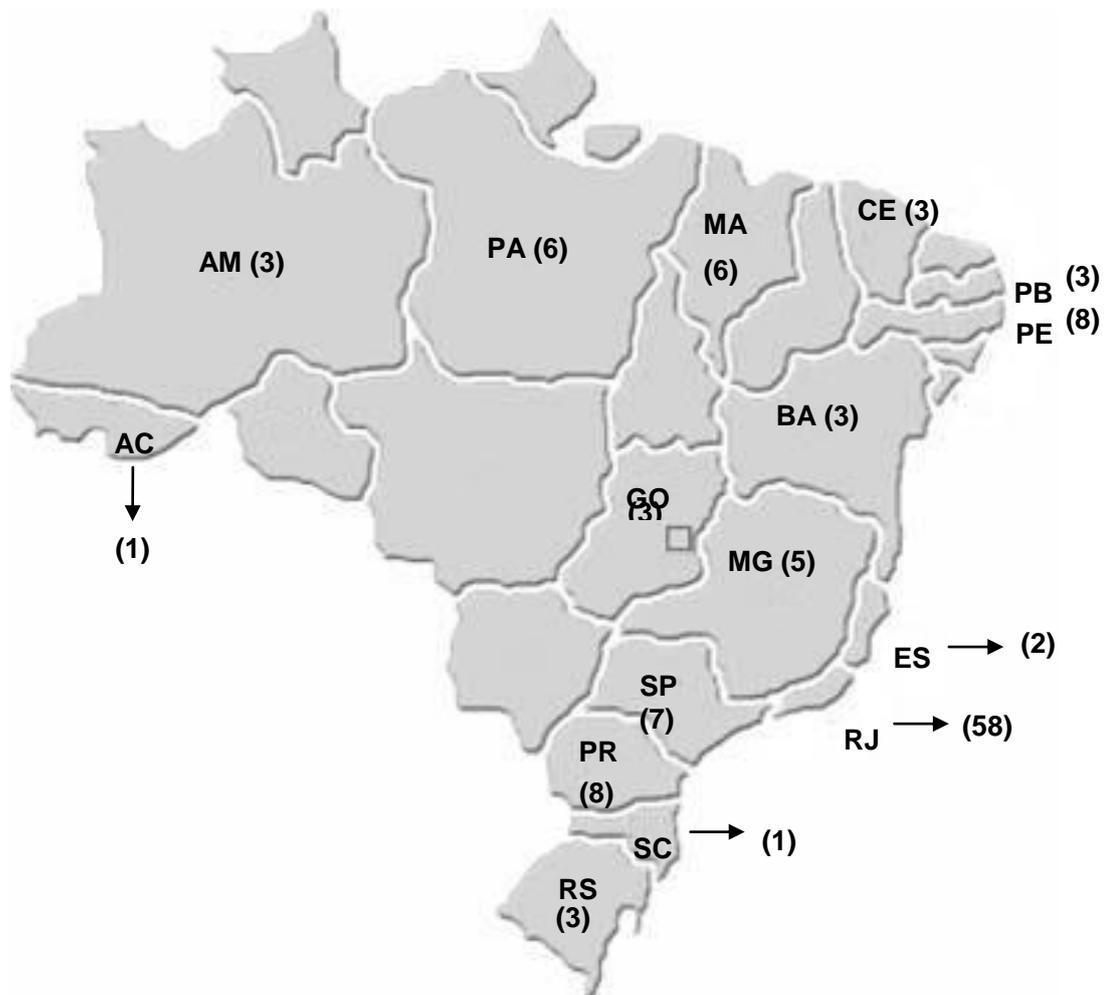


Legenda: Para as 97 cepas resistentes a INH, mutações no códon 315 ocorreram em 75,3% e deleções no códon 4 em 24,7% dos casos.

Com relação à análise do gene *rpoB*, a Figura 19 exibe o mapa do Brasil e a distribuição das cepas para os diversos estados. Como explicitado anteriormente, o Estado do Rio de Janeiro possui a maior incidência de Tb e MR do país, sendo

assim representado por 58 isolados. Os outros 62 isolados encontram-se distribuídos pelos outros 15 estados.

Figura 20 - Mapa do Brasil mostrando os diferentes estados de coleta e número de isolados analisados para o gene *rpoB*



Legenda: Estados: AC – Acre; AM – Amazonas; PA – Pará; MA – Maranhão; CE – Ceará; PB – Paraíba; PE – Pernambuco; BA – Bahia; GO – Goiás; MG – Minas Gerais; ES – Espírito Santo; RJ – Rio de Janeiro; SP – São Paulo; PR – Paraná, SC – Santa Catarina; RS – Rio Grande do Sul.

O perfil de resistência a drogas (INH, RMP, EMB e ST) para 105 dos 120 isolados multiresistentes é mostrado na Tabela 3. Testes para PZA não foram reportados devido à dificuldade de obtenção destes dados em meio LJ. Quinze isolados foram excluídos da tabela por terem apresentado apenas os resultados para INH e RMP, com resultados incompletos para EMB ou ST. No Rio de Janeiro, a

resistência a todas as drogas foi predominante (16 isolados), enquanto nos outros estados a resistência dupla, a INH e RMP foi mais comum (26 isolados).

Tabela 3 - Perfil de resistência a drogas dos isolados multirresistentes^a

Resistência	Rio de Janeiro (N)	Outros estados (N)	Todos os estados (N)
INH + RMP	14 (30,4%)	26 (44,0%)	40 (38,0%)
INH + RMP + EMB	11 (23,9%)	13 (22,0%)	24 (22,9%)
INH + RMP + ST	4 (8,7%)	6 (10,2%)	10 (9,5%)
INH + RMP + EMB + ST	16 (34,8%)	14 (23,7)	30 (28,6%)
(INH S) + RMP + EMB + ST	1 (2,2%)	0 (0,0%)	1 (1%)
Total ^a	46 (100%)	59 (100%)	105 (100%)

INH – isoniazida; RMP – rifampicina; EMB – etambutol; ST - streptomina;

^aPara 15 isolados obtivemos informação para INH e RMP com resultados incompletos para EMB or ST. Estes 15 foram excluídos da tabela.

Entre os 120 isolados MR analisados, não foi encontrada mutação no gene *rpoB* em 13 cepas resistentes a RMP. Doze eram MR, e uma era sensível à INH e resistente à RMP. Estas foram seqüenciadas fora da região RRDR (do códon 161 ao 683) e não foram encontradas mutações exceto uma silenciosa de GAC para GAT (ambos os códons codificam o ácido aspártico). As outras 107 cepas apresentaram 118 diferentes mutações no gene *rpoB*. A Tabela 4 mostra os tipos de mutações detectadas e suas freqüências. Entre as mutações encontradas, 57 ocorreram em isolados do Rio de Janeiro e 61 em isolados de outros estados. Entre as 118 mutações, 96 foram simples, 9 duplas, uma tripla e houve uma inserção. Todas foram mutações pontuais com trocas de aminoácidos. Os códons mais freqüentemente mutados foram: 531 (45,6%), 526 (26%) e 516 (12,5%). Em outros onze códons, um total de 18 (15,2%) mutações foi encontrado, principalmente nos códons 511 (3,4%) e 513 (3,4%). Também foram observadas mutações fora da região RRDR, uma no códon 545, uma mutação simples, e quatro outras nos códons 471, 475, 483 e 545, que estavam presentes em quatro isolados de mutações duplas. Estas últimas apresentaram-se sempre associadas a mutações na região RRDR, nos códons 531 ou 526. Nenhum isolado sensível a RMP (utilizado como controle) apresentou mutação no gene *rpoB*.

Tabela 4 - Resumo das mutações encontradas no gene *rpoB* em 107 de 120 isolados multirresistentes

Codons	Tipo de mutação	N (%)
511	Leu CTG – Pro CCG	1 (0.8)
513	Gln CAA – Pro CCA	3 (2.5)
513	Gln CAA – Leu CTA	1 (0.8)
516	Asp GAC – Tyr TAC	8 (6.8)
516	Asp GAC – Val GTC	5 (4.2)
526	His CAC – Asp GAC	9 (7.6)
	His CAC – Tyr TAC	12 (10.1)
	His CAC – Asn AAC	1 (0.8)
	His CAC – Arg CGC	1 (0.8)
	His CAC – Leu CTC	2 (1.7)
	His CAC – Cys TGC	2 (1.7)
	His CAC – Ser TCC	1 (0.8)
531	Ser TCG – Leu TTG	44 (37.2)
	Ser TCG – Trp TGG	5 (4.2)
545	Leu CTG – Pro CCG	1 (0.8)
511 516	Leu CTG – Pro CCG (511) Asp GAC – Tyr TAC (516)	2 (1.7)
511 518	Leu CTG – Pro CCG (511) Asn AAC – Asp GAC (518)	2 (1.7)
526 483	His CAC – Asn AAC (526) Asp GAC – Gly GGC (483)	2 (1.7)
526 508	His CAC – Tyr TAC (526) Thr ACC – Pro CCC (508)	2 (1.7)

Continuação da Tabela. 4

Codons	Tipo de mutação	N (%)
526 510	His CAC – Tyr TAC (526) Gln CAG –His CAC (510)	2 (1.7)
531 471	Ser TCG – Leu TTG (531) Met ATG – Ile ATT (471)	2 (1.7)
531 475	Ser TCG – Leu TTG (531) Val GTG – Gly GGG (475)	2 (1.7)
531 511	Ser TCG – Trp TGG (531) Leu CTG – Pro CCG (511)	2 (1.7)
531 545	Ser TCG – Leu TTG (531) Leu CTG – Pro CCG (545)	2 (1.7)
531 516 522	Ser TCG – Leu TTG (531) Asp GAC– Glu GAA (516) Ser TCG – Leu TTG (522)	3 (2.5)
514 – 515	Inserção Phe TTC	1 (0.8)
Total ^a		118 (100)

^a Numero total (N) de mutações é a soma das mutações simples, duplas, triplas e inserções. Treze isolados não apresentaram mutações.

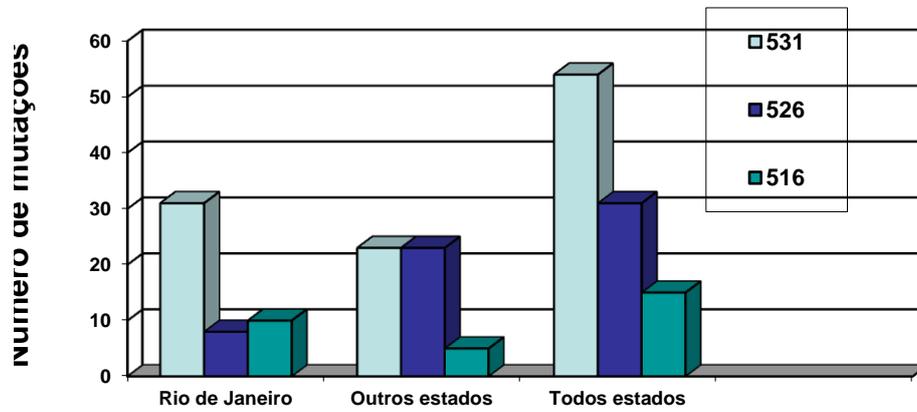
A Tabela 5 mostra o tipo e freqüência de mutações encontradas nos códons 531, 526 e 516, para o Rio de Janeiro e para os outros estados brasileiros. No Rio de Janeiro, as mutações mais freqüentes foram: Ser531 para Leu (21,2%), Asp516 para Tyr (5%) e His526 para Asp (2,5%). Entre os outros estados, as mutações mais freqüentes foram: Ser531 para Leu (19,4%), His526 para Tyr (11%) e Asp516 para Tyr (2,5%).

Tabela 5 - Resumo das mutações encontradas nos códons 531, 526 e 516 do gene *rpoB* no Rio de Janeiro comparado com outros estados e a totalidade dos estados

Codons	RJ	Outros Estados	Todos Estados
516 Acido Aspartico	10 (8,4%)	5 (4,1%)	15(12,5%)
526 Histidina	8 (6,6%)	23 (19,4%)	31 (26%)
531 Serina	31(26,2%)	23 (19,5%)	54 (45,7%)
Outros códons	8 (6.8%)	10 (8.5%)	18 (15.3%)
Total	57 (48.0%)	61 (51.5%)	118 (100%)

A freqüência de mutações encontrada para os códons 531, 526 e 516 foi comparada entre o Estado do Rio de Janeiro, os outros estados e todos os estados. A Figura 16 mostra que, quando o Rio de Janeiro é removido da análise, a freqüência de mutações nos códons 531 e 526 para os outros 15 estados é similar. Apenas a diferença no número de mutações no códon 526 entre Rio de Janeiro e outros estados foi estatisticamente significativa ($p= 0,002$). No entanto, quando todos os estados são analisados ao mesmo tempo, o códon 531 volta a ser o mais freqüentemente alterado.

Figura 21 – Variação do número de mutações nos códons 531, 526 e 516 no Estado do Rio de Janeiro, nos outros estados e em todos os estados brasileiros analisados



Legenda: Apenas a diferença no número de mutações do códon 526 entre o Rio de Janeiro e os outros estados foi estatisticamente significativa ($p= 0.002$) (teste Qui-quadrado).

4 DISCUSSÃO

4.1 Análise do gene *KatG*

A INH é um fármaco com estrutura molecular simples, mas com mecanismo de ação complexo, envolvendo vários genes, sendo os mais importantes o *katG* e o *inhA*. Para o estudo da resistência à INH, por mutações no gene *katG*, analisamos 101 cepas de MTb. Dentre estas, 97 são multirresistentes e quatro são sensíveis à INH. Sete cepas multirresistentes não apresentaram mutação em ambas as regiões analisadas. Assim, pode-se concluir que a mutação responsável pela resistência encontra-se ou em uma região do *katG* não estudada ou se localiza em outro gene relacionado à resistência ao fármaco. Nosso estudo se concentrou em duas regiões próximas, no início do gene *katG*. Mutações (excluindo as mutações silenciosas e os polimorfismos), em qualquer destas regiões são capazes de produzir resistência a INH. Estas regiões apresentam comportamentos diferentes em relação aos números e tipos de mutação.

Na região 1 do gene *KatG* houve grande quantidade de inserções e deleções. Em 24 cepas encontramos um novo alelo, ainda não descrito na literatura, gerado pela deleção do último nucleotídeo (adenina) no códon 4. Na região 2, as mutações no códon 315 foram as mais comuns (72,2% dos 101 casos), principalmente de Serina AGC para Treonina ACC (61 vezes) e para Asparagina AAC (sete vezes). A prevalência de mutações neste códon apresenta ampla variação geográfica no mundo. Estes números são importantes porque podem prever a capacidade de um teste que use apenas a análise do códon 315, para diagnóstico rápido da resistência à INH. Na nossa casuística, a região 1 permitiu o diagnóstico de mutação em nove casos em que não houve mutações na região 2, aumentando a positividade do diagnóstico de resistência à INH em 8,9%. Já a análise da região 2 permitiu o diagnóstico de resistência à INH em 78,2% das cepas, resultado semelhante ao que é observado na literatura. Supondo que estes nove casos tivessem plena possibilidade de serem diagnosticados pela análise do gene *inhA*, teríamos que pesquisar as mutações tanto na parte estrutural quanto na região promotora do gene.

Em outro estudo realizado no Brasil, que analisou 97 cepas INH resistentes de dois estados - São Paulo e Paraná (Cardoso *et al.*, 2004), foram observadas 83 mutações no gene *katG* (85,6%), sendo 60 no códon 315 (61,9%) e 23 (23,7%) em outros códons. Quatorze cepas INH resistentes (14,4%) não tiveram mutações no gene *katG*. Destas, 12 (12,4%) apresentaram mutações em outros genes. O alelo Arginina 463 Leucina (polimorfismo) ocorreu em dois casos (2% dos 97 casos). No local correspondente à nossa região 1, houve uma inserção no nucleotídeo 17 e quatro mutações pontuais. Na área correspondente à nossa região 2, além das mutações pontuais ocorreram duas inserções e uma deleção. Um outro trabalho do Estado de São Paulo analisou 48 cepas resistentes à INH, compreendendo os códons de 243 a 368 (376 nucleotídeos), que correspondem à região 2 da nossa análise. Houve mutação pontual no códon 315 em 60,4% das cepas, sendo a maioria (79,3%) de Serina (AGC) para Treonina (ACC) (Höfling *et al.*, 2005). A análise de 69 cepas resistentes à INH em três estados brasileiros, explorando a região correspondente à nossa região 2, revelou mutações pontuais no códon 315 em 60, 60,9 e 87,1% dos isolados dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, respectivamente. Dois casos de mutação pontual no códon 463 não implicaram em resistência à INH (Silva *et al.*, 2003). Logo, no Brasil, as variações do número de mutações no códon 315 são de 60 a 87,1%.

Uma pesquisa realizada em KwaZulu - Natal, na África do Sul, com 79 cepas multirresistentes de Tb, usando a técnica de polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) para pesquisar mutações em uma região de 209 pares de base que contém o códon 315, diagnosticou 77 casos de resistência à INH (94,7 %) (Kiepiela *et al.*, 2000). Em Barcelona, a análise de 61 cepas INH resistentes mostrou alterações no gene *katG* em 55% dos casos e as mutações no códon 315 foram as mais prevalentes (32%) (Coll *et al.*, 2005). Portanto, em outros países, as variações de mutações no códon 315 vão de 32% em Barcelona a 94,7% na África do Sul.

Em conclusão, a mutação no códon 315, de Serina AGC para Treonina ACC é a mais freqüente em todos os trabalhos. 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.

4.2 Análise do gene *rpoB*

A RMP, embora apresente estrutura química complexa, tem um mecanismo de ação mais simples em relação à INH. Cerca de 95% das cepas resistentes apresentam mutações na região central do gene *rpoB*, com 81 pares de base, delimitada pelos códons 507 a 533 e denominada RRDR (*rifampin resistance determining region*). Neste trabalho analisamos 120 cepas MR de MTb. Treze eram resistentes à RMP e não apresentaram mutações (10,8%). A resistência a RMP somada a ausência de mutação na região RRDR do gene *rpoB* geralmente está relacionada a ocorrência de mutações em outros códons fora desta região, como no 146 ou 251, conforme descrito na literatura (Heep *et al.*, 2001), ou a existência de outro mecanismo de resistência. Foram desenhados oligonucleotídeos específicos para uma região mais abrangente do gene *rpoB* para estas 13 amostras e foi encontrada apenas uma mutação silenciosa, o que aponta para a atuação de um outro mecanismo de resistência que não a mutação.

Uma pesquisa realizada na Federação Russa, com 412 cepas MR e técnica de análise por espectrometria de massa, observou ausência de mutação em 10,7% dos casos (Afanas'ev *et al.*, 2007). Outra possibilidade para este fato, além das descritas acima, é a heterorresistência, definida como a coexistência de bactérias resistentes e sensíveis aos medicamentos para Tb, em um mesmo paciente. É um pré-estágio para a resistência, como um todo, e pode ocorrer por duas causas: a super-infecção, com duas diferentes cepas ou a transformação de uma cepa em duas, uma resistente e outra sensível, pela não aderência do doente ao tratamento. O cultivo em meio com RMP, de uma cepa suspeita de apresentar heterorresistência, seleciona a variante resistente e permite o diagnóstico correto das mutações (Fang *et al.*, 2008). Com a exceção dos casos de resistência primária, nossos pacientes foram submetidos a dois ou mais tratamentos com RMP no esquema terapêutico até o diagnóstico de multirresistência e isso elimina a possibilidade de heterorresistência.

A percentagem de códons mutados na resistência à RMP também sofre influências regionais. Na federação Russa, como já citado, as mutações predominantes ocorreram nos códons 531 (64,8%), 526 (10,3%) e 516 (7,7%) do gene *rpoB*, distribuição semelhante à observada no Brasil. A prevalência de

mutações no códon 531 também ocorre na Alemanha e na Itália, mas nos Estados Unidos e na China, o maior número de mutações ocorre no códon 526 (Afanas'ev *et al.*, 2007).

O diagnóstico de MR só se confirma através de cultura e teste de sensibilidade. O método em meio de Löwenstein-Jensen disponibiliza o resultado em 30 a 60 dias, tempo demasiadamente longo. O método automatizado de cultura para micobactérias, como o sistema BACTEC MGIT 960 (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*) é capaz de fornecer resultado em 10 a 15 dias, mas se torna dispendioso para uso em hospitais públicos (Srisuwanvilai *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2005; Gouveia *et al.*, 2008). O diagnóstico de resistência por mutação em determinados genes a partir do DNA do bacilo cultivado também é dispendioso mas vem permitindo a identificação de regiões gênicas com maior incidência de mutações e promove o desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápidos e pouco trabalhosos, por meio de técnicas de biologia molecular. O método INNO-LiPA Rif. Tb é específico para a RMP e identifica as mutações mais comuns na RRDR (Rossau *et al.*, 1997; Makinen *et al.*, 2006). Os métodos *Genotype MTBDR Assay* e *Real-Time PCR* diagnosticam mutações tanto na RRDR quanto no códon 315 do gene *katG* (Cavusoglu *et al.*, 2006; Viedma *et al.*, 2002; Hilleman *et al.*, 2007). Estes métodos dependem de kits, que também são de alto custo para uso em instituições públicas. Mokrousov e colaboradores (Mokrousov *et al.*, 2002) utilizaram, em seu trabalho, a técnica de PCR-RFLP (PCR- *restriction fragment length polymorphism*) que usa a enzima de restrição *HAPII* para diagnosticar a mutação no códon 315 (Serina AGC para Treonina ACC). Este método tem sido importante como um marcador de resistência para a INH no noroeste da Rússia por ser rápido, ter baixo custo, apresentar manipulação simples e ser fácil de interpretar. O método requer apenas aparelhagem padrão de PCR e de eletroforese. Novas pesquisas precisam ser realizadas para avaliar melhor esta técnica.

Neste trabalho, o Estado do Rio de Janeiro apresentou o maior número de isolados resistentes a todas as drogas de primeira linha no tratamento da tuberculose (INH, RMP, EMB, ST), enquanto, para os outros estados, a maioria dos isolados era resistente apenas a INH e RMP. Várias análises em diferentes regiões do mundo vêm demonstrando percentagens de mutação no gene *rpoB* em ordem decrescente de frequência nos códons 531, 526 e 516. Herrera *et al.* (2003) na Espanha encontrou as seguintes porcentagens: 531- 48.5%, 526- 27.8% e 516-

14.2%. Huang *et al.* (2002) na China, Mani *et al.* (2001) na Índia e Schilke *et al.* (1999) na África, observaram proporções semelhantes. Siddiqi *et al.* (2002) na Índia encontrou um número maior de mutações no códon 516 em comparação ao 526, tendo observado as seguintes frequências: 531- 38.7%, 516- 21.5% e 526- 20.4%. Heep *et al.* (2001) na Alemanha, Tracevska *et al.* (2003) na Latvia – Rússia e Qian *et al.* (2002) em países do leste asiático (China, Korea, Japan e Taiwan) também obtiveram resultados semelhantes.

Observa-se que as várias regiões do mundo mostram dois tipos principais de padrão de mutação, em ordem decrescente: códons 531, 526, 516 e 531, 516, 526. Mas nenhuma associação de mutação específica com um determinado genótipo pôde ser determinada em estudos publicados, quando se analisou a prevalência de mutações no gene *rpoB* no leste asiático ou na Latvia (Qian *et al.*, 2002; Tracevska *et al.*, 2003; Hillemann *et al.*, 2005).

No Brasil, quatro estudos analisaram as mutações no gene *rpoB*, de cepas resistentes à rifampicina (Spindola de Miranda *et al.*, 2001; Valim *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2003; Höfling *et al.*, 2005). Em um deles, Valim *et al.* (2000) estudaram 82 cepas resistentes e 18 sensíveis, isoladas de pacientes do Rio Grande do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro. Os principais códons afetados foram 531 (54%), 526 (21%) e 516 (7%). Três cepas resistentes à RMP (4%) e as cepas sensíveis não apresentaram mutações. Em outro trabalho, Höfling *et al.* (2005) seqüenciaram 25 cepas resistentes à RMP e nove sensíveis, todas do estado de São Paulo. Entre as cepas resistentes houve mutações nos códons 531 (60%), 526 (24%), 533 (4%) e 516 (4%). A única inserção ocorreu entre os códons Phe514 – Met515, o mesmo local em que ocorreu a nossa única inserção, mutação já descrita por Qian *et al.* (2002) para um isolado da cepa Beijing. O nosso estudo mostrou que nas 122 mutações pontuais (com relação a todos os estados) os códons mais afetados foram: 531 (46.8%), 526 (25.3%) e 516 (12.3%). Estes resultados seguem um dos padrões já descritos em várias regiões do mundo.

Spindola de Miranda *et al.* (2001) analisaram mutações em 62 cepas resistentes e sensíveis a RMP. Destas, 25 (18 resistentes) foram obtidos do Brasil (São Paulo e Rio de Janeiro) e 37 (16 resistentes) da França, África e Ásia. Mutações foram identificadas em 100% dos isolados resistentes a RMP provenientes da França (16/16) e em 89% (16/18) nos isolados brasileiros. Nenhuma mutação foi detectada nos 28 isolados sensíveis, como previsto. Entre os isolados

da Fraca, África e Ásia, as mutações ocorreram nos códons 531 (31,2%), 526, 513 e 533 (18,7% cada), 516 (6,2%) e 516 em associação ao 533 (6,2%) enquanto, para os isolados brasileiros, o códon 531 foi o mais freqüentemente mutado (72,2%), seguido pelo 526 (11,1%) e 513 (5,5%).

Como o Estado do Rio de Janeiro apresenta alta incidência de Tb e de TbMR, quisemos comparar as mutações que ocorreram em 58 isolados deste Estado com as presentes em 62 isolados de outros estados brasileiros. O Estado do Rio de Janeiro, mostrou a prevalência da mutação: Ser531 (26,2%), enquanto os outros estados mostraram uma freqüência similar para Ser531 (19,4%) e para His526 (19,4%). Quando é feita a análise para todos os estados, o códon 531 volta a ser o mais freqüentemente alterado, seguido pelo 526 e 516. Nosso estudo foi, até o momento, o de maior número de isolados resistentes analisados no Brasil, e nós consideramos a freqüência de mutações nestes códons como um padrão brasileiro.

4.3 Tuberculose, uma questão social

Logo no início deste trabalho dissemos que a Tb é a principal causa de morte em adultos por doença infecciosa única nos países em desenvolvimento e que seu agente causal infecta um terço da humanidade e causa 8 milhões de novos casos de Tb por ano, com 1,6 milhão de óbitos (Frieden *et al.*, 2003). Estas considerações dão ao MTb o *status* de bactéria especial, com características diferentes e grande poder de infecção e de morte. Afirmamos também que a Tb tem opção preferencial pelos pobres, que são desnutridos, com pouca escolaridade, não valorizam adequadamente a saúde, residem em aglomerações e muitos são vítimas do alcoolismo e dependentes de um sistema de saúde precário (Albuquerque *et al.*, 2001). As características do bacilo, associadas à pobreza e à infecção pelo HIV, completam-se para a progressão e a agressividade da doença (Deriemer *et al.*, 2007). Se não fosse assim, a Tb teria o mesmo perfil de agressividade, tanto em países pobres quanto nos ricos ou em áreas ricas e pobres de uma cidade. Se considerarmos que no mundo existem oitocentos e trinta milhões de miseráveis, passamos a entender que o problema maior da Tb não é o bacilo. A tuberculose tem cura. Seu tratamento se baseia em dois medicamentos principais: isoniazida e

rifampicina. A resistência a um destes fármacos, ou a ambos, compromete bastante a possibilidade de resgate do paciente (Mak *et al.*, 2008; Espinal *et al.*, 2000).

4.4 Considerações sobre estudos epidemiológicos

Vários trabalhos, em biologia molecular, que usam cepas de MTb, analisam previamente as amostras através da técnica de RFLP (restriction fragment length polymorphism) ou *spoligotyping*, não só para estudo epidemiológico, como também para identificar cepas repetidas de um mesmo paciente para eliminá-las. Isto é necessário porque os pacientes MR fazem muitas culturas de escarro durante o tratamento (Holtz *et al.*, 2006). As cepas que recebemos para análise eram identificadas pelo nome e o estado de origem e pudemos eliminar 19 repetidas, sem necessidade de uso das técnicas citadas.

Embora tenhamos analisado mutações nos genes *katG* e *rpoB* de amostras de 13 e 16 estados, respectivamente, não tivemos o objetivo inicial de fazer estudos epidemiológicos. Mas é interessante procurarmos saber se existe o genótipo Beijing no Brasil e, existindo, como se comporta a associação HIV/multirresistência. 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 *cluster* de quatro casos 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 TbMR na população em geral, como tem sido descrito em microepidemias de TbMR e HIV em países com baixa incidência de Tb. Esta associação é encontrada em populações restritas em presídios ou em clínicas para pacientes HIV positivos. A frequência, no Brasil, da associação TbMR e HIV é de 8% (Baptista *et al.*, 2002).

4.5 Tuberculose X – DR

A Tb – XDR (resistência pelo menos à INH e à RMP, pelo menos a uma medicação de segunda linha injetável – canamicina, amicacina ou capreomicina - e a qualquer fluoroquinolona) surgiu como uma grande ameaça para o mundo (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 (WHO, 2008c). O tratamento deste tipo de Tb é extremamente difícil, pela escassez e preço de fármacos sensíveis. Na Coreia, um grupo de 1.407 pacientes, com diagnóstico de MR (definição internacional), HIV-negativos, foram analisados como uma coorte por sete anos. Setenta e cinco casos apresentavam Tb – 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, de 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 a média de 5,3 medicamentos. Os fármacos mais usados foram: capreomicina 25 vezes (53,2%), moxifloxacina 34 (72,3%), ou levofloxacina 20 (42,6%), cicloserina 47 (100%), etionamida 31 (66,0%), amoxicilina + clavulanato 47 (100%) e clofazimina 46 (97,9% - medicamento já não mais em 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).

Com relação aos pacientes analisados neste estudo, existe a possibilidade de vários MR falidos serem XDR. São pacientes que tomaram amicacina, ofloxacina, terizidona, etambutol e clofazimina (esta até 2005) 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. Os testes de sensibilidade para ofloxacina e amicacina podem classificar vários destes doentes como XDR.

CONCLUSÕES

- a) A análise das regiões 1 e 2 do gene *katG* diagnosticou a resistência à isoniazida em 87,1% dos 101 isolados analisados;
- b) A análise da região 1 aumenta o diagnóstico genotípico da resistência à isoniazida, por mutação pontual, deleção ou inserção no gene *KatG* e deve ser estudada em conjunto com a região 2;
- c) A região 1 do gene *katG* se caracterizou pela predominância de deleções, principalmente no códon 4 (24,7% das 97 cepas resistentes a INH);
- d) A região 2 do gene *katG* mostrou predominância de mutações pontuais, principalmente no códon 315 (75,3% das 97 cepas resistentes a INH);
- e) Mutações concomitantes nas duas regiões do gene *KatG* não são comuns (21,6% das 97 cepas resistentes a INH);
- f) A mutação mais freqüente na região 2 do gene *katG* foi de Serina AGC para Treonina ACC (78,3% das 60 cepas que apresentaram mutação somente na região 2);
- g) Sete cepas resistentes a INH não tiveram mutação nas regiões de análise do *KatG*, o que indica a presença de mutação em outros genes relacionados a resistência a esta droga;
- h) A ausência de mutações, nas cepas resistentes à INH, indica que as mutações podem ter ocorrido em outra região do *katG* não analisada, ou em outro gene ligado a resistência à INH;
- i) A análise do gene *rpoB* diagnosticou a resistência à rifampicina em 89,2% das cepas;
- j) Quase todas as amostras apresentavam mutações pontuais únicas no gene *rpoB* ou muito próximo a ela;
- k) Todas as mutações no gene *rpoB* ocorreram na RRDR;
- l) No gene *rpoB*, o padrão de mutações no Brasil (Serina, Histidina e Ácido aspártico) coincide com o padrão de vários outros países;
- m) Apenas uma mutação silenciosa foi encontrada nas 13 amostras seqüenciadas do gene *rpoB* fora da região RRDR, o que indica estar havendo um outro mecanismo de resistência que não a mutação.

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.
- ALBUQUERQUE MF, LEITÃO CCS, CAMPELO ARL, SOUZA WV, SALUSTIANO A. Fatores prognósticos para o desfecho do tratamento da tuberculose pulmonar em Recife, Pernambuco, Brasil. *Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* 2001;9(6):368-74.
- ALMEIDA EA, SANTOS MAA, AFIUNE JB, SPADA DTA, FIUZA DE MELO FA. Rendimento da cultura de escarro na comparação de um sistema automatizado com o meio de Lowenstein – Jensen para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. *J Bras Pneumol.* 2005; 31(3):231-236.
- 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.
- 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.
- BIERRENBACH AL, DUARTE EC, GOMES ABF, SOUZA MFM. Tendência da mortalidade por tuberculose no Brasil, 1980 a 2004. *Rev Saúde Pública.* 2007; (Supl 1):15-23.
- BIERRENBACH AL, GOMES ABF, NORONHA EF, SOUZA MFM. Tuberculosis incidence and cure rates, Brazil, 2000-2004. *Rev Saúde Pública.* 2007; 41(Supl 1):18.
- BIFANI PJ, MATHEMA B, KUREPINA NE, KREISWIRTH N. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *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.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.

- CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HELIO FRAGA. Tuberculose Multirresistente. Guia de Vigilância Epidemiológica. Rio de Janeiro, 2006.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HELIO FRAGA. Sistema de vigilância epidemiológica da tuberculose multirresistente. Boletim nº 1. 1994-2006. Rev Bras Pneumol Sanit 2007;15(1):29-38.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HELIO FRAGA. Manual de Bacteriologia da tuberculose. 3a ed. Rio de Janeiro. 2005. p 135-9.
- 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.
- CARDOSO RF, COOKSEY RC, MORLOCK GP, BARCO P, CECON L, 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.
- 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.
- CAIN KP, BENOIT SR, WINSTON CA, MAC KENZIE WR. Tuberculosis among foreing-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.
- CAVUSOGLU C, TURHAN A, AKINCI P, SOYLER I. Evaluation of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates. J Clinical Microbiology. 2006;44(7):2338-42.
- 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.

COLL P, ARAGON LM, ALCAIDE F, ESPASA M, GARRIGÓ M, GONZÁLEZ J et al. Molecular analysis of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates recovered from Barcelona. *Microb Drug Resist*. 2005;11 (2):107-14.

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 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.

DALCOLMO MP, ANDRADE MK, PICON PD. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. *Rev Saúde Pública*. 2007;41(Supl. 1):34-42.

DEWAN P, SOSNOVSKAJA A, THOMSEN J, CICENAITE K, JOHANSEN I, DAVIDAVICIENE E, WELLS C. High prevalence of drug-resistant tuberculosis, Republic of Lithuania 2002;9:170-174.

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

DERIEMER K, KAWAMURA LM, HOPEWELL PC, DALEY CL. Quantitative impact of human immunodeficiency virus infection on tuberculosis dynamics. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(9):936-44.

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.

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.

ESPINAL MA, KIM SJ, SUAREZ PG, Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: Treatment outcome in 6 countries. *JAMA*. 2000; 283(19):2537-45.

FANG R, LI X, LI J, WU J, SHEN X, GUI X ET AL. Mixed infection of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients in Shanghai, China. 2008;88(5):469-73.

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

FRIEDEN TR, STERLING T, PABLO-MÉNDEZ A, KILBURN JO, CAUTHEN JO, DOOLEY SW. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med*. 1993;328 (8):521-6.

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.

FRIEDEN TR, STERLING TR, MUNSIF SS, WATT CI, DYE C. Tuberculosis. *Lancet* 2003;362:887-99.

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.

GOUVEIA AC, EISENACH KD, VINHAS SA, RIBEIRO FK, PERES RL, DIETZE R ET AL. Use of in-house PCR for identification of *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC broth cultures of respiratory specimens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(4):386-91

GUTTMACHER AE, COLLINS FS. Genomic medicine - a primer. *N Engl J Med* 2002; 347:1512-1520.

HEEP M, BRANDSTÄTTER B, RIEGER U ET AL. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol*. 2001;39(1):107-10.

HERRERA L, JIMENES S, VALVERDE A, GARCIA-ARANDA MA, SAEZ-NIETO JA. Molecular analysis of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Spain (1996-2001). Description of new mutations in the *rpoB* gene and review of the

literature. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21:403-408.

HEYM B, SAINT-JOANES B, COLE ST. The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Lung Dis*. 1999;79(4):267-71.

HIJJAR MA, PROCÓPIO MJ, FREITAS LMR, GUEDES R, BETHLEM E. Epidemiologia da tuberculose no mundo, no Brasil e no Rio de Janeiro. *Pulmão RJ*. 2005;14(4):310-4.

HIJJAR MA. Tuberculose no Brasil. Acesso em 20/09/2008. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/TB/tb_num/tb_brasil.pps

HILLEMANN D, RÜSCH-GERDES S, RICHTER E. Evaluation of the Geno Type MTBDRplus assay for rifampin and isoniazida susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. 2007;45(8):2635-40.

HILLEMANN D, KUBICA T, RÜSCH-GERDES S, NIEMANN S. Disequilibrium in distribution of resistance mutations among *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and non-Beijing strains isolated from patients in Germany. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2005;49(3):1229-1231

HOLTZ TH, STERNBERG M, KAMMERER S, LASERSON KF, RIEKSTINA V, ZAROVSKA E ET AL. Time to sputum culture conversion in multidrug-resistant tuberculosis: predictors and relationship to treatment outcome. *Ann Intern Med*. 2006;144(9):650-9.

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.

KATO-MAEDA M, BIFANI PJ, KREISWIRTH BN, SMALL PM. The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 2001; 107:533-537.

KENYON TA, VALWAY SE, IHLE WW, ONORATO IM, CASTRO KG. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during a long airplane flight. *N Engl J Med*. 1996;334(15):933-8.

KIEPIELA P, BISHOP KS, SMITH AN, ROUX L, YORK DF. Genomic mutations in the katG, inhA and ahpC genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kwazulu Natal, South Africa. *Tuberc Lung Dis*. 2000;80(1):47-56.

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. [Epub ahead of print]

KREMER K, GLYNN JR, LILLEBAECK T, NIEMANN S, NATALIA E, KUREPINA, KREISWIRTH BN, BIFANI PJ, VAN SOOLINGEN 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, 2a edição, 2000; 1-24.

KUBICA T, RÜSCH-GERDER 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 Kazakhsan. *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.

LODDENKEMPER R, SAGEBIEL D, BRENDEL A. Strategies against multidrug resistant tuberculosis. *Eur Respir J*. 2002; 20(Suppl.36)66s-77s.

MAK A, THOMAS A, DEL GRANADO M, ZALESKIS R, MOUZAFAROVA N, MENZIES D. Influence of multidrug resistance on tuberculosis treatment outcomes with standardized regimens. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(3):306-12.

MÄKINEN J, MARTTILA HJ, MARJAMÄKI M, VILJANEN MK, SOINI H. Comparison of two commercially available DNA Line Probe Assays for detection of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clinical Microbiology*. 2006;44(2):350-352.

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.

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.

MENDONÇA R. O paradoxo da miséria. *Revista Veja*. Rio de Janeiro. Edição 1735 23 de janeiro de 2002. Acesso em 8/10/2008. Disponível em: http://veja.abril.com.br/230102/p_082.htm

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.

MOKROUSOV I, NARVSKAYA O, OTTEN T, LIMESCHENKO E, STEKLOVA L, VYSHNEVSKIY B. High prevalence of *katG* ser315Thr substitution among isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(5):1417-24.

MONTINHO M, VANZELLER M, FORTE M, C. *Rev Port Pneumol*. 2003;IX(5 Suppl1):13.

NATAL S. A retomada da importância da tuberculose como prioridade para ações de saúde pública. *Bol Pneumologia Sanit* 1998; 6:35-52.

NATAL S. Emergência da resistência às drogas. *Bol Pneumol Sanit*. 2002;10(2):47-70.

NORRBY SR, NORD CE, FINCH R. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *The Lancet Infect Dis*. 2005;5(2):115-9.

OLIVEIRA HB, MOREIRA FILHO DC. Recidiva em tuberculose e seus fatores de risco. *Pan Am J Public Health*. 2000;7(4):232-41.

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.

PAOLO WF, NOSANCHUK JD. Tuberculosis in the New York city: recent lessons and a look ahead. *The Lancet Infectious Diseases*. 2004;4 May:287-93.

PETER F, BARNES M.D, DONALD CAVE M. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *The new england journal of medicine* 2003; 349:1149-56.

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.

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.

QIAN L, ABE C, LIN TP ET AL. rpoB genotypes of Mycobacterium tuberculosis Beijing family isolates from East Asian countries. J Clin Microbiol 2002;40:1091-1094.

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.

ROSSAU R, TRAORE H, DE BEENHOWER H, MIJS W, JANNES G, DE RIJK P ET AL. Evaluation of the INNO-LiPA Rif TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(10):2093-8.

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. Impacto da reforma do setor saúde sobre os serviços de tuberculose no Brasil. Bol Pneumologia Sanitária 1999; 7:7-18.

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.

SCHILKE K, WEYER K, BRETZEL G ET AL. Universal pattern of RpoB gene mutation among multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:620-626.

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

SEISCENTO M, FIÚZA DE MELO FA, IDE NETO J, NORONHA AML, AFIUNE JB, INOMATA T ET AL. Tuberculose multirresistente (TBMR): aspectos clínico laboratoriais, epidemiológicos e terapêuticos. *J Pneumol*. 1997;23(5):237-44.

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.

SIDDIQI N, SHAMIM M, HUSSAIN S ET AL. Molecular characterization of multidrug resistance isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients in North India. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:443-450.

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 Brazilian 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. Tratamento da tuberculose. In Jansen JM, Capone D, Lopes AJ. Tuberculose. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2006;Ano 5, julho/dezembro:96-104.

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.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. *J Pneumologia* 2004a; (S1)junho: S30- S31.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Diretrizes Brasileiras para a Tuberculose. Tratamento da tuberculose. *J Pneumol*. 2004b; 30(Supl 1):S24-37.

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.

SPINDOLA DE MIRANDA S, KRITSKI A, FILLIOL I, MABILAT C, PANTEIX G, DROUET E. Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Brazil and France. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96:247-250.

SRISUWANVILAI LO, MONKONGDEE P, PODEWILS LJ, NGAMLERT K, POBKEEREE V, PURIPOKAI P ET AL. Performance of the BACTEC MGIT 960 compared with solid media for detection of *Mycobacterium* in Bangkok, Thailand. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2008;61(4):402-7.

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 L, PERKINS MD, JOHNSON JL, KELLER R, PALACI M, DETTONI VV ET AL. Infection and disease among household contact of patients with multidrug resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001;5(4):321-8.

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

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

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.

TOUNGOUSOVA 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.

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.

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.

VIEDMA DG, INFANTES MSD, LASALA F, CHAVES F, ALCALÁ L, BOUZA E. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):988-995.

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.

WOODWORTH JS, BEHAR SM. *Mycobacterium tuberculosis* –specific CD8+ T cells and their role in immunity. *Crit Rev Immunol*. 2006;26(4):317-52.

World Health Organization (WHO) Global Tuberculosis Control: surveillance, planning financing. WHO report 2003. Geneva (WHO/CDS/TB2003.331.)

WHO/UNAIDS. Global HIV/aids. 2007. Acesso em 15/07/2008. Disponível em: www.who.int/globalatlas/dataQuery/default.asp

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

World Health Organization. (WHO, 2006b). Stop TB partnership and World Health Organization. Global Plan to Stop TB 2006-2015. Geneva. 2006.

World Health Organization (WHO, 2006c). Report of the meeting of the WHO Global Task Force on XDR-TB. Geneva, Switzerland, 9-10 October 2006. Acesso em

01/10/2008. Disponível em:
http://www.who.int/entity/tb/challenges/xdr/news_oct06.pdf

World Health Organization. The global task force on XDR-TB. Update February 2007. Stop TB Department. Acesso em 01/10/2008. Disponível em:
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. Acesso em 01/10/2008. Disponível em:
http://www.who.int/tb/publications/2008/drs_report4_26feb08.pdf

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

World Health Organization (WHO 2008c). XDR-TB. Extensively drug-resistant tuberculosis – what, where, how and action steps. Acesso em 01/10/2008. Disponível em: http://www.euro.who.int/Document/TUB/XDR_TB_fact_sheet.pdf

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

ZAGER EM, MCNERNEY R. Multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infectious Diseases* 2008. <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.

**ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário
Pedro Ernesto – UERJ**



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



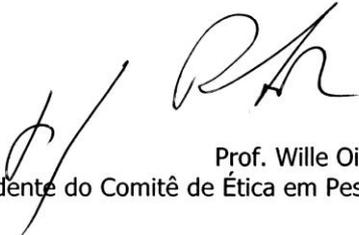
Rio de Janeiro, 25 de outubro de 2006

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Aut. Helio Ribeiro de Siqueira
Orient. Prof. Rodolfo Mattos Albano

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1547-CEP/HUPE) " MUTAÇÕES NOS GENES RPOB E KATG DE CEPAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTENTES À RIFAMPICINA E À ISONIAZIDA, DE CULTURAS DE UM CENTRO DE REFERÊNCIA PARA MULTIRRESISTÊNCIA " aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.


Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B - Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains arising from mutations in two different regions of the *katG* gene

Original Article

Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains arising from mutations in two different regions of the *katG* gene*

Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida por mutações em duas regiões diferentes do gene *katG*

Helio Ribeiro de Siqueira, Flávia Alvim Dutra de Freitas, Denise Neves de Oliveira, Angela Maria Werneck Barreto, Margareth Pretti Dalcolmo, Rodolpho Mattos Albano

Abstract

Objective: To analyze and compare the mutations in two different regions of the *katG* gene, which is responsible for isoniazid (INH) resistance. **Methods:** We analyzed 97 multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in cultures of sputum samples obtained from the Professor Hélio Fraga Referral Center, in Brasília, Brazil. Another 6 INH-sensitive strains did not present mutations and were included as controls. We used PCR to amplify two regions of the *katG* gene (GenBank accession no. U06258)—region 1, (from codon 1 to codon 119) and region 2 (from codon 267 to codon 504)—which were then sequenced in order to identify mutations. **Results:** Seven strains were resistant to INH and did not contain mutations in either region. Thirty strains carried mutations in region 1, which was characterized by a high number of deletions, especially at codon 4 (24 strains). Region 2 carried 83 point mutations, especially at codon 315, and there was a serine-to-threonine (AGC-to-ACC) substitution in 73 of those cases. The analysis of region 2 allowed INH resistance to be diagnosed in 81.4% of the strains. Nine strains had mutations exclusively in region 1, which allowed the proportion of INH-resistant strains identified to be increased to 90.6%. **Conclusions:** The number of mutations at codon 315 was high, which is consistent with cases described in Brazil and in other countries, and the analysis of region 1 resulted in a 9.2% increase in the rate at which mutations were identified.

Keywords: Isoniazid; Mutation; Tuberculosis; Drug resistance, multiple.

Resumo

Objetivo: Analisar e comparar as mutações em duas regiões diferentes do gene *katG*, responsáveis pela resistência à isoniazida (INH). **Métodos:** As análises foram feitas em 97 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes isoladas de culturas de escarro provenientes do Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Outras 6 cepas, sensíveis à INH, não apresentaram mutações e foram incluídas como controle. Duas regiões do gene *katG* (GenBank nº de acesso U06258) — região 1, do códon 1 até o códon 119, e região 2, do códon 267 até o códon 504 — foram amplificadas por PCR e sequenciadas para a identificação das mutações. **Resultados:** Sete cepas eram resistentes à INH e não mostraram mutação nas duas regiões. Trinta cepas apresentaram mutações na região 1, que se caracterizou por um grande número de deleções, especialmente no códon 4 (24 cepas). A região 2 mostrou 83 mutações pontuais, principalmente no códon 315, com 73 casos de troca de serina (AGC) para treonina (ACC). A análise da região 2 permitiu o diagnóstico de resistência à INH em 81,4% das cepas. Nove cepas tiveram mutações somente na região 1, e isso permitiu o aumento de identificação de cepas resistentes à INH para 90,6%. **Conclusões:** O número de mutações do códon 315 foi elevado, compatível com os casos descritos no Brasil e em outros países, e a análise da região 1 aumentou a detecção de mutações em mais 9,2%.

Descritores: Isoniazida; Mutação; Tuberculose; Resistência a múltiplos medicamentos.

* Study carried out in the Genome Laboratory of the Roberto Alcântara Gomes Institute of Biology, *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ, Rio de Janeiro State University – Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence to: Helio Ribeiro de Siqueira. Av. 28 de setembro, 77, 2º Andar, Disciplina de Pneumologia e Tisiologia, Vila Isabel, CEP 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Tel 55 21 2587-6348. E-mail: drhelio@infolink.com.br

Financial support: None.

Submitted: 1 October 2008. Accepted, after review: 16 March 2009.

Introduction

Despite the scientific advances of the past two decades, TB remains the world's leading cause of death due to a single infectious agent, *Mycobacterium tuberculosis*—approximately two million deaths per year.⁽¹⁾ This disease predominantly affects poor people in developing countries, and its incidence has increased significantly since the advent of HIV in the 1980s.⁽²⁻⁴⁾ Multidrug resistance (MDR)—resistance to at least isoniazid (INH) and rifampin (RIF),^(5,6) in accordance with international standards—and extensively drug resistant TB—MDR associated with resistance to a fluoroquinolone and one more injectable drug (amikacin, capreomycin or kanamycin)—have been spreading due to migration flows and currently represent a serious threat to the world, in the absence of new drugs that can revert this situation.^(7,8) In Brazil, an epidemiological study of resistance to the drugs used in the treatment of TB showed greater INH resistance in treatment-naïve patients (primary resistance) and in retreatment patients (acquired resistance)—4.4% and 11.3%, respectively.⁽⁹⁾ Those values were low for RIF, primary resistance and acquired resistance being 1.3% and 6.6%, respectively. Total resistance to the other drugs was low (streptomycin, 0.3%; ethambutol, 0.1%; and pyrazinamide, practically 0%). Combined primary resistance to INH and RIF was 1.1%. This made it possible to make the initial treatment for TB in Brazil using a combination of three drugs—INH, RIF and pyrazinamide. Currently, ethambutol is being introduced as a fourth drug, similarly to what has been done in countries where primary resistance is high.⁽¹⁰⁾ Mutation in specific genes of the bacillus is the principal mechanism of survival (resistance) in relation to a certain drug and occurs when the bacterium remains in an environment in which the concentration of the drug is lower than the minimum inhibitory concentration (acquired resistance).⁽¹¹⁾ Unlike RIF resistance, in which 95% of the mutations occur in a well defined region of the *rpoB* gene,⁽¹²⁻¹⁴⁾ INH resistance can arise from mutations in various genes, the most important being the *katG* gene (in 32-93% of the cases) and the promoter region of the *inhA* gene (in approximately 15%).^(15,16) The *katG* gene encodes the catalase-peroxidase enzyme, which is important in the metabolism of the bacillus.⁽¹⁷⁾ This enzyme activates INH, which is a pre-drug,

producing oxygen-derived free radicals (superoxide, hydrogen peroxide and peroxy-nitrate) and organic free radicals that inhibit the formation of mycolic acids of the bacterial wall and cause DNA damage.^(18,19) The most common mutation in the *katG* gene appears at codon 315 due to serine-to-threonine (AGC-to-ACC) substitution, with decreased catalase activity, which results in INH resistance.⁽²⁰⁾ The *inhA* gene encodes the fatty acid-carrying protein (NADH-dependent enoyl-ACP reductase), which is essential in the synthesis of mycolic acid of the cell wall.^(16,17) Activated INH binds to NADH and inhibits the activity of the NADH-dependent enzyme, resulting in bacterial death, due to interference with the synthesis of mycolic acid. The mutation in the *inhA* gene modifies the enzyme, which loses affinity for NADH, resulting in INH resistance.⁽¹⁹⁾ The importance of other genes, such as *kasA*, *ndh* and the *oxyR-ahpC* intergenic region, has yet to be established, and further studies are required.

The *katG* gene has 2,224 bases and 742 codons. Since the number of mutations occurring at codon 315 is significant, the region containing it has been extensively studied. The same is not true for the initial region of the gene, where there might be a significant number of mutations responsible for INH resistance.

The objective of the present study was to analyze the mutations in two different regions of the *katG* gene—the initial region and the region containing codon 315—as well as to compare these regions in terms of type and number of mutations.

Methods

The survey, from which the present study originated, was approved by the Research Ethics Committee of the Pedro Ernesto University Hospital, Rio de Janeiro State University.

For this analysis, we used 97 MDR-TB strains isolated from patients with pulmonary TB. The samples were provided by the Professor Hélio Fraga Referral Center, in Brasília, Brazil. Another 6 strains, which were sensitive to INH and RIF and did not present mutations, were used as controls. Of the MDR-TB strains studied, 56 belonged to patients from the state of Rio de Janeiro and 41 belonged to patients from another 12 states: Pernambuco (n = 6); Maranhão (n = 5); Pará (n = 5); São Paulo (n = 5); Ceará (n = 4); Paraná

Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains arising from mutations in two different regions of the katG gene

775

(n = 4); Bahia (n = 3); Goiás (n = 3); Amazonas (n = 2); Paraíba (n = 2); Espírito Santo (n = 1); and Minas Gerais (n = 1). In 84 cases, the material was collected between 2002 and 2003, and, in 13, the material was collected between 1995 and 1997, when the epidemiological study of drug resistance was carried out.⁽⁹⁾ Of those cases, 4 presented primary MDR.

Drug resistance patterns were determined on Löwenstein-Jensen medium using the proportion method, in accordance with standard procedures, at critical concentrations and proportions of resistant mutants of 40 µg/mL and 1% for RIF, respectively, and of 0.2 µg/mL and 1% for INH, respectively.⁽²¹⁾

Genomic DNAs were obtained from strains cultured on Löwenstein-Jensen medium, as described by one group of authors.⁽²²⁾ The analysis of the katG gene (GenBank accession number U06258) concentrated on two regions of interest. Region 1 extends from nucleotide 1, codon 1 (GTG, valine)—first amino acid of the encoded protein and the beginning of the gene—to nucleotide 357, codon 119. This region was amplified by PCR using the following oligonucleotide primers: katG sense, 5' A CTT CGC GAT CAC ATC CGT G 3' and katG antisense, 5' GCG GCC GTC GTG GAT GCG GTA 3'. Region 2, with 711 nucleotides, starts at nucleotide 801, codon 267, ends at nucleotide 1512, codon 504, and was amplified using the following oligonucleotide primers: katG sense, 5' CGG CGG TCA CAC TTT CGG TA 3' and katG antisense, 5' CCC GAC TTG TGG CTG CAG GC 3'. All PCRs were performed using Platinum Taq (Invitrogen, Germany), 1.5 mM of MgCl₂, 15 pmol of each oligonucleotide, 0.2 mM of dNTPs, ×1 PCR buffer (provided by the manufacturer) and 40 ng of genomic DNA. The PCR parameters were as follows: denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95°C for 45 s, 63°C for 45 s and 72°C for 1 min, and a final extension time of 10 min at 72°C. The PCR amplifications were analyzed by agarose gel electrophoresis, and the purified amplicons (amplified DNA fractions) were analyzed on a MegaBACE 1000 automated DNA sequencer (GE Healthcare, Sunnyvale, CA, USA). The consensus sequences of each sample were compared with the wild-type *M. tuberculosis* katG sequence (GenBank accession number U06258) in order to determine the mutations.

Table 1 - Strains with mutations exclusively in region 1.

Codons with mutations	Strains, n
Deletion at codon 79	1
Deletion at codon 107	2
Deletion at codon 4	2
Deletion at codon 4 + Deletion at codon 65	1
Deletion at codon 4 + Mutation at codon 1 Val (GTG) → Ala (GCG)	1
Mutation at codon 93 Ala (GCC) → Thr (ACC)	1
Total	9

Ala: alanine; Thr: threonine; and Val: valine.

Results

Of the strains studied, 7 were MDR-TB and did not present mutations in either region. The remaining 90 strains had mutations in at least one of the regions of the katG gene, which correlates the mutations with INH resistance.

Tables 1, 2 and 3, respectively, show the mutations (point mutations, insertions and deletions) occurring exclusively in region 1, exclusively in region 2 and in the area comprising regions

Table 2 - Strains with mutations exclusively in region 2.

Codons with mutations	Strains, n
Mut at codon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC)	43
Mut at codon 315 Ser (AGC) → Asn (AAC)	5
Mut at codon 315 Ser (AGC) → Thr (ACA)	1
Mut at codon 315 Ser (AGC) → Ile (ATC)	1
Mut at codon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC) + Deletion at codon 485	1
Mut at codon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC) + Deletion at codon 493	1
Mut at codon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC) + Mut at codon 399 Glu (GAA) to Glu (GAG) ^b	1
Mut at codon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC) + Mut at codon 463 Arg (CGG) to Leu (CTG) ^a	1
Mut at codon 336 Leu (CTG) → Pro (CCG)	1
Mut at codon 439 Gln (CAG) → TAG ^c	1
Mut at codon 463 Arg (CGG) → Leu (CTG) ^a	2
Insertion at codon 439	2
TOTAL	60

Mut: mutation; Arg: arginine; Asn: asparagine; Gln: glutamine; Glu: glutamic acid; Ile: isoleucine; Leu: leucine; Pro: proline; Ser: serine; and Thr: threonine. ^aPolymorphism. ^bSilent mutation. ^cStop codon.

Table 3 - Strains that carried mutations in both regions.

Region 1 - Codons with mutations	Region 2 - Codons with mutations	Strains, n
Deletion at codon 4	Mut at codon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC)	12
Deletion at codon 4	Mut at codon 315 Ser (AGC) → Asn (AAC)	2
Deletion at codon 4	Mut at codon 315 Ser (AGC) → Thr (ACA)	1
Deletion at codon 4	Mut at codon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC)+	1
	Mut at codon 463 Arg (CGG) → Leu (CTG) ^a	
Deletion at codon 4	Mut at codon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC) +	1
	Mut at codon 399 Glu (GAA) → Glu (GAG) ^b	
Deletion at codon 4	Mut at codon 328 Trp (TGG) → Arg (CGG) +	1
	insertion at codon 439	
Deletion at codon 4 + deletion at codon 26 +	Mut at codon 315 Ser (AGC) → Thr (ACC)	1
deletion at codon 65		
Deletion at codon 4 + deletion at codon 2 +	Mut at codon 412 Trp (TGG) → Cys (TGC)	1
deletion at codon 11		
Mut at codon 17 Ser (AGC) → Thr (ACC) +	Mut at codon 315 Ser (AGC) → Thr (ACA)	1
insertion between codons 92 and 93		
Total		21

Mut: mutation; Ala: alanine; Arg: arginine; Asn: asparagine; Cys: cysteine; Glu: glutamic acid; Ile: isoleucine; Leu: leucine; Pro: proline; Ser: serine; Thr: threonine; Trp: tryptophan; and Val: valine. ^aPolymorphism. ^bSilent mutation.

1 and 2. With the exception of silent mutations and mutations at arginine codon 463 (considered polymorphic because they do not produce INH resistance), any other type of mutation, in one or both of the regions, always produces INH resistance.

As can be seen in Table 1, 9 strains presented mutations exclusively in region 1. Table 2 shows that 60 strains presented mutations exclusively in region 2. Table 3 describes the mutations that occurred in 21 strains, both in region 1 and in region 2.

In the 30 strains in region 1 (Tables 1 and 3), there were 33 nucleotide deletions, the deletion of the last nucleotide of codon 4 occurring alone 20 times and in combination with other mutations 4 times. Only 1 insertion and 3 mutations were registered. In the 81 strains in region 2 (Tables 2 and 3), there were 2 deletions, 3 insertions and 83 point mutations, 73 of which were at codon 315 (in 75.2% of the 97 cases). The serine-to-threonine (AGC-to-ACC) mutation occurred 62 times (56 times as an isolated form and 6 times in combination with mutations at other codons). The serine-to-asparagine (AGC-AAC) mutation occurred 7 times, the serine-to-threonine (AGC-to-ACA) mutation occurred 3 times, and the serine-to-isoleucine (AGC-to-ATC) occurred 1 time. In this same region, there was

1 silent mutation at codon 399—a glutamic acid-to-glutamic acid (GAA-to-GAG) mutation—in combination with another mutation—a serine-to-threonine (AGC-to-ACC) mutation, responsible for INH resistance. In 2 strains, there were isolated mutations at codon 463, and, in another 2, the mutations were in combination with the mutation at codon 315. The mutation at codon 439—a glutamine (CAG)-to-(TAG) mutation—encodes a codon that stops RNA synthesis (stop codon). The mutations in region 2 allowed INH resistance to be diagnosed in 79 strains (without considering the two polymorphisms—codon 463), that is, in 81.4% of the 97 cases. There were 9 strains that did not carry mutations in region 2, although they had mutations in region 1. This means that the analysis of region 1 allowed a 9.2% increase in the rate at which INH resistance was diagnosed, which increased the positivity of the method to 90.6%.

Discussion

Mutations in the *katG* gene occur at a hundred-fold higher frequency than do those in the *rpoB* gene. Mutations in the latter should raise the possibility of mutations in the former as well in view of the frequency at which such mutations occur. This fact could not be evaluated in our sample because the strains were

previously selected for being MDR. The 7 cases without mutation in either region were resistant to INH. This shows that the mutations that caused INH resistance occurred outside the regions of the katG gene studied or occurred in other genes.^[23]

In region 1, there were a large number of insertions and deletions, resulting in an amino acid change in the protein, reduced catalase levels and INH resistance. In 24 strains, we found a new allele, which has not been previously described, generated by the deletion of the last adenine nucleotide at codon 4, region 1. Region 2 was essentially characterized by mutations, most of which were at codon 315. This mutated codon is an important marker of INH resistance, and its frequency suffers marked regional variations. A study conducted in Brazil analyzed 97 INH-resistant strains from two states (São Paulo and Paraná).^[23] The authors observed 83 mutations in the katG gene (85.6%), 60 (61.9%) of which were at codon 315 and 23 (23.7%) of which were at other codons. Of the 97 strains studied, 14 (14.4%) did not have mutations in the katG gene. Of those, 12 (12.4%) presented mutations in other genes. An arginine-to-leucine substitution at position 463 (polymorphism) occurred in 2 cases (2.1%). In the space corresponding to region 1 in our study, there was 1 insertion at nucleotide 17 and 4 mutations. In the area corresponding to region 2 in our study, there were 2 insertions, 1 deletion and 74 mutations, principally serine-to-threonine mutations, 58 of which were at codon 315. Another study conducted in the state of São Paulo analyzed 48 INH-resistant strains, extending from codon 243 to codon 368 (376 nucleotides), which corresponds to region 2 in our analysis. In 60.4% of the strains, there were point mutations at codon 315, most of which (79.3%) were serine-to-threonine (AGC-to-ACC) mutations.^[24] In one study, the analysis of 69 INH-resistant strains, exploring the space corresponding to region 2 in our study, revealed point mutations at codon 315 in 87.1%, 60.9% and 60.0% of the isolates from the states of Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro and São Paulo, respectively.^[25] Two cases of mutation at codon 463 did not imply INH resistance (polymorphism). In our sample, the analysis of region 2 allowed INH resistance to be diagnosed in 81.4% of the strains, a result similar to those reported in the literature. In our

study, the analysis of region 1 resulted in a 9.2% increase in the rate at which INH resistance was diagnosed.

The prevalence of mutations at codon 315 varies greatly, according to the world's geographic regions. In Kwazulu Natal, South Africa, a study of 79 MDR-TB strains—using single-stranded conformation polymorphism analysis in order to detect mutations in a region of 209 base pairs that contains codon 315—diagnosed 77 cases of INH resistance (97.4%).^[26] In Barcelona, the analysis of 61 INH-resistant strains revealed alterations in the katG gene in 55% of the cases, and the mutations at codon 315 were the most prevalent (in 32%).^[27] Similar results were seen in the evaluation of 45 INH-resistant strains in Italy, when 17 cases of mutation at codon 315 were identified (37.8%).^[28] In a study conducted in Russia, mass spectrometry was used for the sequencing of 317 INH-resistant isolates from the Moscow region, western Siberia and the Urals region. There were 244 mutations at codon 315 (76.9%), 243 of which were serine-to-threonine (AGC-to-ACC) mutations. In another 44 strains, there were serine-to-threonine (AGC-to-ACC) mutations accompanied by mutations in the mabA-inhA intergenic region and only 3 mutations in the inhA gene. Therefore, there were 288 mutations at codon 315 (90.8%), and 26 INH-resistant strains (8.2%) did not carry mutations in the two genes.^[29]

The serine-to-threonine (AGC-to-ACC) mutation at codon 315 is the most common in all studies. Possibly, this type of mutation provides an optimal balance between decreased catalase activity and sufficient peroxidase activity, which allows the resistant bacterium to remain active, with a minimal metabolism reduction.^[16]

Based on the knowledge generated by the analysis of the mutations that cause resistance to INH and Rif, it has become possible to develop simpler molecular techniques for diagnosing resistance using kits, although these kits are too expensive to be routinely used in the public health care system.^[30]

In conclusion, the analysis of region 1 results in an increase in the rate at which the genotypic diagnosis of INH resistance—arising from mutations, deletions or insertions in the katG gene—is reached. In addition, region 1 should be studied in combination with region 2.

Acknowledgments

The authors would like to thank Professors Rogério Rufino and Claudia Henrique da Costa for their critical reading of the manuscript.

References

- Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet*. 2003;362(9387):887-99.
- Mendes JM, Lourenço MC, Ferreira RM, Fonseca Lde S, Saad MH. 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.
- Hijjar MA, Procópio MJ, Freitas LMR, Guedes R, Bethlem E. Epidemiologia da tuberculose: importância no mundo, no Brasil e no Rio de Janeiro. *Pulmão RJ*. 2005;14(4):310-14.
- Silveira JM, Sassi RA, Oliveira Netto IC, Hetzel JL. Prevalence of and factors related to tuberculosis in seropositive human immunodeficiency virus patients at a reference center for treatment of human immunodeficiency virus in the southern region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2006;32(1):48-55.
- Barroso EC, Mota RM, Santos RO, Sousa AL, Barroso JB, Rodrigues JL. Fatores de risco para tuberculose multiresistente adquirida. *J Pneumol*. 2003;29(2):89-97.
- Dalcolmo MP, Andrade MK, Picon PD. Multiresistant tuberculosis in Brazil: history and control [Article in Portuguese]. *Rev Saude Publica*. 2007;41 Suppl 1:34-42.
- Matteelli A, Migliori GB, Cirillo D, Centis R, Girard E, Ravighion M. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5(5):857-71.
- Andrews JR, Sliyah NS, Gandhi N, Moll T, Friedland G; Tugela Fery Care and Research (TF CARES) Collaboration. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: implications for the HIV epidemic and antiretroviral therapy rollout in South Africa. *J Infect Dis*. 2007;196 Suppl 3:S482-90.
- Braga JU, 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(1):76-81.
- Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro de Tuberculose - Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. *J Pneumol*. 2004;30(Suppl 1):S4-S56.
- Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption -- a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(7):697-714.
- Mokrousov I, Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, Steklova L, Vysheveskiy B. High prevalence of KatG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(5):1417-24.
- Schilke K, Weyer K, Bretzel G, Amthor B, Brandt J, Sticht-Groh V, et al. Universal pattern of RpoB gene mutations among multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1999;3(7):620-6.
- Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(2):267-74.
- Telenti A. Genetics and pulmonary medicine. 5. Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax*. 1998;53(9):793-7.
- Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, Jasperse L, Pan X, Wanger A, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(4):1241-50.
- 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 isoniazid resistance. *Mol Microbiol*. 1996;22(3):583-92.
- Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis*. 1998;79(1):3-29.
- Slayden RA, Lee RE, Barry CE 3rd. Isoniazid affects multiple components of the type II fatty acid synthase system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 2000;38(3):514-25.
- Slayden RA, Barry CE 3rd. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*. 2000;2(6):659-69.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2005.
- van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 1991;29(11):2578-86.
- Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, et al. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(9):3373-81.
- Höfling CC, Pavan EM, Giampaglia CM, Fenazoli L, Aily DC, de 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.
- Silva MS, Senma SG, Ribeiro MO, Valim AR, Telles MA, Kritski A, et al. Mutations in katG, inhA, and ahpC genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4471-4.
- Kiepiela P, Bishop KS, Smith AN, Roux L, York DF. Genomic mutations in the katG, inhA and aphC genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kwazulu Natal, South Africa. *Tuber Lung Dis*. 2000;80(1):47-56.
- Coll P, Aragón LM, Alcaide F, Espasa M, Garrigó M, González J, et al. Molecular analysis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Barcelona. *Microb Drug Resist*. 2005 Summer;11(2):107-14.

Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains arising from mutations in two different regions of the katG gene

779

28. Rindi L, Bianchi L, Tortoli E, Lari N, Bonanni D, Garzelli C. Mutations responsible for *Mycobacterium tuberculosis* isoniazid resistance in Italy. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005;9(1):94-7.
29. Afanas'ev MV, Ikiyannikova LN, Il'ina EN, Sidorenko SV, Kuz'min AV, Laionova EE, et al. Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(6):1057-64.
30. Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, Soyler I. Evaluation of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol*. 2006;44(7):2338-42.

About the authors

Helio Ribeiro de Siqueira

Assistant Professor. Department of Pulmonology and Phthisiology, *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ, Rio de Janeiro State University – School of Medical Sciences, Rio de Janeiro, Brazil.

Flávia Alvim Dutra de Freitas

Biologist. Department of Biochemistry, Roberto Alcântara Gomes Institute of Biology, *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ. Rio de Janeiro State University – Rio de Janeiro, Brazil.

Denise Neves de Oliveira

Biologist. Genome Laboratory. Department of Biochemistry, Roberto Alcântara Gomes Institute of Biology, *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ, Rio de Janeiro State University – Rio de Janeiro, Brazil.

Angela Maria Werneck Barreto

Chief Bacteriologist. Laboratory of Mycobacteriology, Professor Hélio Fraga Referral Center, Oswaldo Cruz Foundation – Rio de Janeiro, Brazil.

Margareth Pretti Dalcolmo

Coordinator. Multidrug Resistance Outpatient Clinic. Professor Hélio Fraga Referral Center, Oswaldo Cruz Foundation – Rio de Janeiro, Brazil.

Rodolpho Mattos Albano

Adjunct Professor. Roberto Alcântara Gomes Institute of Biology, *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ, Rio de Janeiro State University – Rio de Janeiro, Brazil.

ANEXO C - Evolução clínica de um grupo de pacientes com TB multirresistente atendidos em um centro de referência na cidade do Rio de Janeiro

Original Article

Clinical evolution of a group of patients with multidrug-resistant TB treated at a referral center in the city of Rio de Janeiro, Brazil*

Evolução clínica de um grupo de pacientes com TB multirresistente atendidos em um centro de referência na cidade do Rio de Janeiro

Helio Ribeiro de Siqueira, Flávia Alvim Dutra de Freitas, Denise Neves de Oliveira, Angela Maria Werneck Barreto, Margareth Pretti Dalcolmo, Rodolpho Mattos Albano

Abstract

Objective: To analyze the clinical characteristics and evolution of a group of patients with positive sputum cultures for multidrug-resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* and treated at a referral center in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Methods:** Based on the positive results in sputum cultures for MDR *M. tuberculosis*, 50 patients were selected, and their clinical data were obtained from the Brazilian Ministry of Health MDR-TB Database. The frequencies of noncompliance, relapses, failures and previous treatments for TB up to diagnosis of MDR-TB were compiled. The radiological patterns were classified as unilateral or bilateral, and with or without cavitation. Two years after the end of the standard treatment for MDR-TB, the outcome (cure, failure, noncompliance or death) for each patient was evaluated and reassessed every two years. The post-treatment follow-up period was eight years. **Results:** The mean number of previous treatments was 2.3 ± 0.9 . The mean interval between the initial diagnosis and the development of MDR-TB was 2.0 ± 1.7 years. Two years after the initial treatment for MDR-TB, 2 patients had abandoned treatment, 8 had died, 18 had been cured, and 22 had presented treatment failure. The bivariate analysis showed that bilateral pulmonary involvement and cavitory pattern markedly reduced the chances for cure, with a relative risk of 1-0.6 (40%) and 1-0.7 (30%), respectively. At the end of the follow-up period, 2 patients had abandoned treatment, 9 had presented treatment failure, 17 had been cured, and 22 had died. **Conclusions:** Bilateral pulmonary involvement and cavity pattern greatly reduced the chances for cure of the patients with MDR-TB. Most patients who presented treatment failure died within the 8-year follow-up period.

Keywords: Tuberculosis, multidrug-resistant; Treatment outcome; Disease-free survival; Treatment refusal; Treatment failure.

Resumo

Objetivo: Analisar as características clínicas e a evolução de um grupo de pacientes com culturas de escarro positivas para *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente (MR) e tratados em um centro de referência no município do Rio de Janeiro. **Métodos:** A partir dos resultados de *M. tuberculosis* MR em culturas de escarro, foram selecionados 50 pacientes cujos dados clínicos foram obtidos através do Banco de Dados TBMR do Ministério da Saúde. Foram considerados a frequência de abandono, as recidivas, as falências e os tratamentos prévios para TB até o diagnóstico de TBMR. O padrão radiológico foi classificado em uni- ou bilateral, e cavitário ou não. Dois anos após o término do tratamento padronizado para TBMR, o desfecho (cura, falência, abandono ou óbito) de cada paciente foi avaliado e repetido a cada dois anos. O período de seguimento foi de oito anos após o tratamento. **Resultados:** A média do número de tratamentos prévios foi de $2,3 \pm 0,9$. O tempo médio entre o diagnóstico inicial e o desenvolvimento de TBMR foi de $2 \pm 1,7$ anos. Após dois anos do tratamento inicial para TBMR houve 2 abandonos, 8 óbitos, 18 curas e 22 falências. A análise bivariada mostrou que o comprometimento pulmonar bilateral e o padrão cavitário reduziram acentuadamente a chance de cura, com risco relativo de 1-0,6 (40%) e 1-0,7 (30%), respectivamente. Ao final do seguimento, houve 2 abandonos, 9 falências, 17 curas e 22 óbitos. **Conclusões:** O comprometimento pulmonar bilateral e lesões cavitárias reduziram a possibilidade de cura dos pacientes com TBMR. A maioria dos pacientes com falha de tratamento evoluiu para óbito no período de 8 anos. **Descritores:** Tuberculose resistente a múltiplos medicamentos; Resultado de tratamento; Sobrevivência livre de doença; Recusa do paciente ao tratamento; Falha de tratamento.

* Study carried out at the *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ, Rio de Janeiro State University – Rio de Janeiro, Brazil. Correspondence to: Helio Ribeiro de Siqueira. Rua Pontes Correa, 38, apto. 501, Tijuca, CEP 20510-050, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel 55 21 2208-0015. E-mail: drhelio@infolink.com.br
Financial support: None.

Submitted: 10 March 2008. Accepted, after review: 26 May 2008.

Introduction

Tuberculosis continues to be the single-agent infectious disease that kills the largest number of people worldwide.⁽¹⁾ The situation is aggravated by the emergence of bacteria that are resistant to the principal drugs used and by the high dissemination capacity of such bacteria.⁽²⁾ In Brazil, there were 81,485 new TB cases in 2004, which corresponds to an incidence of 48.5 cases/100,000 population—with great regional variations and the estimated mortality is 5,000 cases per year.⁽³⁾ The state of Rio de Janeiro has the highest incidence of TB in the country: 87.5/100,000 population. In the city of Rio de Janeiro, this number increases to 105/100,000 population, reaching a much greater proportion in some pockets of poverty. A nationwide epidemiological survey carried out by the Brazilian National Ministry of Health (NMH) from 1996 to 1997 showed that the rate of acquired resistance for the combination of isoniazid (INH) and rifampin (RMP) was 7.9%, whereas the rate of primary resistance was 1.1%.⁽⁴⁾ Since this value is low, it allows, for TB cases not treated previously, the use of regimen I, which includes three drugs—INH, RMP and pyrazinamide (PZA) unlike the regimen including four drugs, which is standardized in many countries.⁽⁵⁾

Poor compliance and noncompliance with treatment are the leading causes of multidrug-resistant TB (MDR-TB) related deaths and of the progressive increase in primary resistance.⁽⁶⁾ Internationally, MDR-TB is defined as resistance to at least INH and RMP. In Brazil, since there is regimen III streptomycin (SM), PZA, ethambutol (EMB) and ethionamide—standardized by the NMH and administered in health care facilities,⁽⁵⁾ MDR-TB is defined as resistance to INH, RMP and at least one more drug (SM, PZA or EMB) or as resistance to INH and RMP and failure of regimen III. These are the definitions of MDR-TB adopted in the present study.^(6,7) The treatment for MDR-TB standardized by the NMH included the use of five drugs: clofazimine; EMB (or PZA); amikacin; terizidone; and ofloxacin. In 2005, clofazimine was withdrawn from the regimen, as recommended by the World Health Organization (WHO). The treatment, dispensed through the NMH Professor Hélio Fraga Referral Center for Tuberculosis and administered for 18 to 24 months, is known to be less effective than are first line regimens, as well

as presenting greater side effects and being much more expensive.^(1,7)

The MDR-TB epidemiological surveillance database shows that, between 2000 and 2006, a total of 2,600 new cases of this form of TB were reported in Brazil. In 96% of the cases, resistance was acquired, with an average of 2.8 previous treatments. The rate of primary resistance was 4%, and the rate of TB/HIV co-infection was 8%. The data reveal that 66% of the cases presented bilateral pulmonary cavitations and 12% presented unilateral cavitations. Of the patients treated, 56% were cured, 8% abandoned treatment, 25% died, and 11% presented treatment failure and chronic disease. Between 2000 and 2002, 45% of the MDR-TB cases occurred in the state of Rio de Janeiro.^(1,2)

The principal mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to the drugs currently used is genetic mutation. This mechanism occurs whenever the bacterium remains in contact with the drug, for a variable period of time, at concentrations below the minimum inhibitory concentration, or the strain already presents a specific natural mutation that makes it resistant to the drug and is selected by an inappropriate treatment regimen.^(1,2)

The present study originated from a survey, conducted in collaboration with Professor Hélio Fraga referral center, of MDR *M. tuberculosis* strains isolated from sputum samples Löwenstein Jensen (LJ) medium—using a molecular biology technique. Each culture corresponded to one patient. The objective was to determine the damage that those genetically modified bacteria caused to patients, as well as to analyze the clinical evolution of such patients.

Methods

The survey from which the present study originated was approved by the Ethics in Research Committee of the Pedro Ernesto University Hospital, *Universidade Estadual do Rio de Janeiro* (UERJ, Rio de Janeiro State University).

Initially, the data of 58 patients living in the city of Rio de Janeiro and nearby towns were examined based on the identification of the respective cultures, whose sensitivity tests were performed on LJ medium using the propor

tion method.⁽¹⁴⁾ The information was obtained from the MDR-TB epidemiological surveillance database of the NMH. The fact that we opted to include only patients from Rio de Janeiro allowed us to review the charts and analyze the cases more properly. Eight cases were excluded due to missing data. The group of 50 patients became a cohort in which the observations were divided into two phases: the first phase, from the initial diagnosis of TB to the development of MDR-TB; and the second phase, from the diagnosis of MDR-TB to the final outcome (cure, failure, death or permanent noncompliance with treatment). In order to facilitate the analysis, the second phase was divided into two-year follow-up periods, up to eight years or more. In the first two years, the patients were treated for MDR-TB with the standardized regimen including the five drugs mentioned above, with some modifications, according to the needs of each case. The outcomes in this period were as follows: cure, with consistent negative conversion of cultures up to month 12 of treatment, and with cultures remaining negative for more than six months of treatment, with no clinical or radiological signs of active disease; permanent noncompliance; death; and treatment failure, with persistence of positive cultures up to month 12 of treatment.⁽¹¹⁾

For the analysis, we considered the following: sensitivity test results; age of patients in the initiation of treatment for TB (pre-MDR-TB) and year of initiation; gender; race; level of education; comorbidities; results of the treatment

with regimen I, regimen IR (regimen I plus EMB) and regimen III, as standardized by the NMH⁽⁹⁾; frequencies of treatments, noncompliance, cure followed by relapse and failure before the diagnosis of MDR-TB; type of resistance (acquired or primary); time taken to develop MDR-TB; radiological pattern (unilateral or bilateral lesion, with or without cavitation) at the moment MDR-TB was diagnosed; body weight fluctuation between treatment initiation and the final outcome; hospitalizations during the evolution of the case; and outcome. Primary resistance was defined as MDR-TB acquired from a known TB contact, usually familial, and absence of noncompliance during the initial treatment. The index cases are not part of our sample. The treatments were self-administered or partially supervised. In this group, none of the patients were submitted to surgery with the objective of curing MDR-TB.

As part of the routine of the referral center, the patients, during the treatment for MDR-TB, were monitored monthly, at which time sputum cultures were performed. Those presenting failure were monitored every three months, and continued using the terizidone-EMB-ofloxacin regimen throughout the follow-up period.

The information collected was compiled in an Excel® 2003 spreadsheet and analyzed using the programs Epi Info, version 3.4, which is a public domain program, and the Number Cruncher Statistical System 2000 (NCSS Inc., Kaysville, UT, USA). The results of the analysis of categorical variables are presented as percentages.

Table 1 - Drug resistance of the strains isolated from patients during the phase of multidrug-resistant TB.

Number of drugs with resistant strains	Drugs tested and pattern of resistance ^a	Number of resistant strains (n = 50)
5	RMP-INH-PZA-EMB-SM	12
4	RMP-INH-PZA-EMB-SM ^b	3
	RMP-INH-PZA-EMB ^c -SM	2
	RMP-INH-PZA-/-SM	1
	RMP-INH-/-EMB-SM	3
3	RMP-INH-/-EMB-SM ^b	7
	RMP-INH-/-EMB ^b -SM	6
	RMP-INH-/-/-SM	1
	RMP-INH-/-EMB-/-	4
	RMP-INH-PZA-EMB ^b -SM ^c	6
	RMP-INH-PZA ^b -EMB-SM ^c	1
	RMP-INH-PZA-/-/-	1
2	RMP-INH-PZA ^b -EMB ^b -SM ^b	3

RMP: rifampin; INH: isoniazid; PZA: pyrazinamide; EMB: ethambutol; SM: streptomycin. ^aThe slash (/) indicates lack of result. There was no result for PZA in 21 strains, for EMB in 3 strains and for SM in 2 strains. ^bSensitive drugs.

and those of continuous variables are presented as means and respective SD. The strength of the association between risk factors and the outcome studied was measured using relative risk (RR) and the respective 95% CI. The statistical significance of the differences observed among dichotomous variables was analyzed using Pearson's chi-square test and Fisher's exact test, when indicated, whereas the statistical significance of the differences observed among numerical variables was analyzed using the Kruskal Wallis test. Figures are used in order to make the results more easily understood.

Results

Table 1 lists the results of culture sensitivity tests to first-line drugs. In 21 cases, there was no result for PZA due to the difficulty in maintaining an acid pH on LJ medium during the sensitivity test. In 3 cases, there was no result for EMB, and, in 2, there was no result for SM. The initial TB treatment was administered between 1991 and 2003, and the diagnosis of MDR-TB was made between 1995 and 2003. Patient ages at treatment initiation ranged from 14 to 66 years (mean \pm SD: 33.8 \pm 13.3 years). Most patients (62.0%) were male. There was a predominance of mulatto and black patients over the other categories. It was observed that most patients (48%) had completed elementary school or junior high and only 8.0% were illiterate. Regarding comorbidities, 12 patients (24.0%) presented previous conditions, such as alcoholism (6 cases), HIV infection/AIDS (3 cases), asthma (1 case), COPD (1 case) and mental illness (1 case). All of the 50 cases initially received regimen I. Of those, 21 abandoned treatment, 18 presented failure (1 underwent retreatment with regimen I, regimen III and regimen IR, whereas the others underwent retreatment with regimen III), and 9 were cured and subsequently relapsed. We obtained no information about 2 cases. Of the remaining 48 patients, 34 received regimen III—29 of whom presented failure and 5 of whom abandoned treatment—whereas 14 patients did not receive regimen III. The mean number of treatments for TB was 2.3 (ranging from 1 to 6), whereas the mean number of patients who abandoned treatment was 0.8 (range, 0-3) and the mean number of patients who presented failure was 1.2 (range, 0-3). Resistance was acquired by 44 patients (88%), and 6 presented primary

Table 2 – Clinical and demographic variables of the 50 patients during the treatment for TB and during the treatment for multidrug-resistant TB.

Variable	Result
Age, mean \pm SD	33.8 \pm 13.3
Gender, n (%)	
Male	31 (62.0)
Female	19 (38.0)
Race, n (%)	
Caucasian	21 (42.0)
Mulatto	13 (26.0)
Black	10 (20.0)
Not stated	6 (12.0)
Years of schooling, n (%)	
0 (illiterate)	4 (8.0)
1 to 3	13 (26.0)
4 to 7	11 (22.0)
8 to 11	8 (16.0)
Comorbidities, n (%)	
Yes*	12 (24.0)
No	38 (76.0)
Initial TB treatment, mean \pm SD	
Number of patients who were cured or relapsed	0.3 \pm 0.6
Number of patients who abandoned treatment	0.8 \pm 0.9
Number of patients who presented treatment failure	1.2 \pm 0.8
Time (in years) to the diagnosis of MDR-TB, mean \pm SD	2 \pm 1.7
Pulmonary involvement, n (%)	
Bilateral	38 (76.0)
Unilateral	12 (24.0)
Radiological pattern, n (%)	
With cavitation	36 (72.0)
Without cavitation	14 (28.0)
Hospitalization, n (%)	
Yes	21 (42.0)
No	21 (42.0)
Not known	8 (16.0)
Clinical evolution after a 2-year period, n (%)	
Cure	18 (36.0)
Failure	22 (44.0)
Death	8 (16.0)
Noncompliance with treatment	2 (4.0)
Clinical evolution after an 8-year period, n (%)	
Cure	17 (34.0)
Failure	9 (18.0)
Death	22 (44.0)
Noncompliance with treatment	2 (4.0)

MDR-TB: multidrug-resistant tuberculosis. *Comorbidities: alcoholism (6 cases), HIV infection/AIDS (3 cases), mental illness (1 case), asthma (1 case) and COPD (1 case).

resistance. The mean interval up to the diagnosis of MDR-TB was 2 years (ranging from less than 1 year to 6 years). The mean age of the patients at the time of MDR-TB diagnosis was 36.4 years (range, 14-69 years; the 14-year-old patient was a case of primary resistance, diagnosed early). Of the 48 patients who received treatment for MDR-TB and were evaluated in the first 2-year period (2 abandoned treatment in this phase), 12 (24%) initially presented unilateral lung disease and 36 (76%) presented bilateral lesions. In addition, 72% of those 48 patients presented cavitations. In this period, 6 (12.5%) of the 12 patients with unilateral disease were cured, 1 (2%) died after 26 days of treatment (HIV and mediastinal abscess due to MDR-TB), and the remaining 5 (10.4%) presented treatment failure. Within the same period, of the 36 cases with bilateral involvement, 12 (25%) were cured, 17 (35.4%) presented treatment failure, and 7 (14.6%) died (Figure 1). The remaining epidemiological and clinical aspects are presented in Table 2. The interval between the diagnosis of MDR-TB and the last piece of information obtained about the patient ranged from less than 1 year to 10 years (mean \pm SD: 2.9 \pm 2.4 years). The number of patients who were cured, presented failure or died by follow-up period is presented in Figure 2.

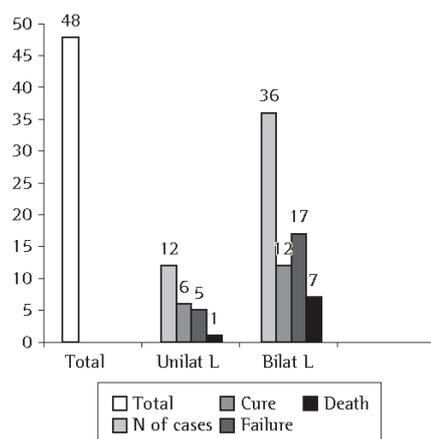


Figure 1 - Number of patients after two years of treatment for multidrug-resistant TB (two patients abandoned treatment) and type of outcome after these two years of treatment by type of pulmonary lesion diagnosed at treatment initiation: unilateral lesion (Unilat L) or bilateral lesion (Bilat L).

After the second year of treatment, the number of patients who were cured decreased slightly. One patient considered cured relapsed, underwent retreatment and presented failure. We preferred not to use the Kaplan-Meier survival curve since we believe that Figure 2 offers more information. This chart was constructed taking into account the follow-up period for each patient. The last period refers to an 8-year follow-up period or longer. At the end of this period, 2 (4%) of the 50 patients diagnosed with MDR-TB had abandoned treatment, 17 (34%) had been cured (effectiveness of treatment), 9 (18%) continued presenting treatment failure, and 22 (44%) had died.

Table 3 presents the results of the bivariate analysis performed to identify the factors associated with the cure of MDR-TB after the first 2-year follow-up period. The 2 cases, mentioned above, of patients who abandoned treatment were excluded. A statistically significant difference was found between the patients who were cured (cured group) and the others (uncured group) in terms of mean age (38.0 vs. 30.5 years, respectively; $p = 0.04$). There was a statistically significant difference in body weight between the cured and the uncured group in the initial phase of the treatment (58.0 vs. 49.0 kg; $p = 0.02$) and in the final phase (63.8 vs. 47.8 kg; $p < 0.001$).

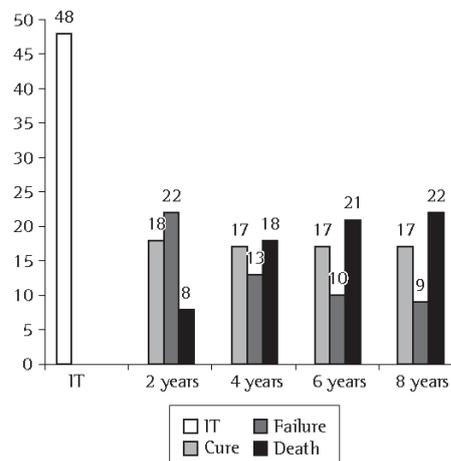


Figure 2 - Type of patient outcome from the initial period of treatment (IT) for multidrug-resistant TB up to an eight-year follow-up period. After the first two years, the number of patients who were cured decreased slightly. Only one patient presented recurrence.

Although there were no statistically significant differences between the two groups in terms of the other variables, it is of note that, among the patients who were cured, there was a lower percentage of bilateral pulmonary involvement (66.7% vs. 80.0%) and a lower percentage of cavitary disease (60.0% vs. 76.7%). Bilateral pulmonary involvement reduced by 40% the chance for cure within 2 years (RR, 1-0.6), whereas radiological cavitary pattern reduced this chance by 30% (RR, 1-0.7), as shown in Table 3.

Discussion

Between 2000 and 2006, there were 2,600 new cases of MDR-TB in Brazil.⁽¹¹⁾ However, in

the same period, approximately 30,000 patients died (5,000 per year),⁽¹²⁾ many of whom were still possibly sensitive to regimen I or at least to regimen III, or were never diagnosed with TB.⁽¹⁵⁾ The impossibility of seeking or finding appropriate medical treatment, noncompliance with treatment and relapse, which are often related to alcoholism, poor socioeconomic conditions and HIV co infection, explain the high mortality and the development of MDR-TB.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ The directly observed therapy, short-course strategy, has been the most successful method to reduce noncompliance, the number of deaths and the number of MDR-TB cases, and its implementation has been made a priority in the country, although, to date, this has happened slowly and in a nonuni-

Table 3 – Bivariate analysis of the factors associated with cure of multidrug-resistant TB after a two-year follow-up period (n = 48).

Variable	Cure (n = 18)	No cure (n = 30)	RR	p
Age, mean ± SD	38.9 ± 13.5	30.5 ± 12.2	---	0.04*
Initial weight, mean ± SD	58.0 ± 8.8	49.3 ± 11.1	---	0.02*
Final weight, mean ± SD	63.8 ± 8.2	47.8 ± 12.0	---	< 0.001*
Number of previous treatments, mean ± SD	2.4 ± 1.1	2.2 ± 0.7	---	0.96
Number of patients who were cured, mean ± SD	0.29 ± 0.5	0.26 ± 0.7	---	0.56
Number of patients who abandoned treatment, mean ± SD	1.1 ± 1.0	0.59 ± 0.7	---	0.09
Number of patients who presented treatment failure, mean ± SD	1.1 ± 0.8	1.4 ± 0.7	---	0.18
Gender, n (%)				
Male	13 (72.2)	17 (56.7)	1	0.28
Female	5 (27.8)	13 (43.3)	2.0 (0.5-8.5)	
Race, n (%)				
Black	4 (22.2)	9 (30.0)	0.7 (0.1-3.0)	0.73
Others	12 (66.6)	17 (60.4)	1	
Comorbidities, n (%)				
Yes	4 (22.2)	6 (20.0)	1.1 (0.5-2.6)	1.0
No	14 (77.8)	24 (80.0)	1	
Type of resistance, n (%)				
Primary	2 (11.1)	4 (13.3)	0.9 (0.3-3.0)	1.0
Acquired	15 (83.3)	25 (83.3)	1	
Pulmonary involvement, n (%)				
Unilateral	6 (33.3)	6 (16.7)	0.6 (0.3-1.2)	0.29
Bilateral	12 (66.7)	24 (80.0)	1	
Pulmonary involvement, n (%)				
With cavitation	12 (60.0)	23 (76.7)	0.7 (0.4-1.6)	0.51
Without cavitation	6 (40.0)	7 (23.3)	1	
Hospitalization, n (%)				
Yes	8 (44.4)	19 (63.3)	0.6 (0.3-1.3)	0.2
No	10 (55.6)	11 (36.7)	1	

RR: relative risk. *Statistical significance.

form manner.⁽¹⁹⁾ It is of note that there were few HIV/AIDS cases and few cases of alcoholism in our sample. This is possibly due to the fact that the patients had already been selected from a larger group by having survived the initial manifestation of the disease. The gold standard for the diagnosis of primary resistance is the sensitivity test of the material obtained before the first treatment. Operationally, this is difficult, and that is why the definition presented was used, making it possible to diagnose MDR-TB more rapidly in the 6 patients, and only 1 patient received regimen III.⁽²⁰⁾ Techniques to identify clusters can definitely diagnose the identity of the strain exhibiting primary resistance with that of the index case.⁽²¹⁾ Table 3 shows that there were only small differences between the cured and the uncured group in terms of the following items, which resulted in MDR-TB: number of previous treatments; number of patients who abandoned treatment; number of patients who relapsed; and number of patients who presented failure. Therefore, the great differential was the severity of pulmonary lesions, which depends on the virulence of the bacillus and the immunity of the patient in this phase.⁽²²⁾ In the initial 2-year period of treatment for MDR-TB, evolution was proportionally poorer and the number of deaths was proportionally greater among the patients with bilateral lesion and cavitation than among those with unilateral lesion. In addition, the number of deaths was 7 times greater among the patients with bilateral lesions. The incidence of TB is lower in females, and survival is higher in younger patients.⁽²²⁾ In the present study, patients in the older group were cured more often than were those in the younger group, and the number of females who were cured was 2 times lower than was the number of males cured (RR = 2). The severity of pulmonary lesions in the initiation of treatment for MDR-TB was more important than were natural protective factors. The initial 2-year period, in which the treatment for MDR-TB occurred, defined whether the outcome would be favorable (cure) or unfavorable (treatment failure or death). The patients who were cured clearly presented weight gain, whereas the worsening of the case and death were announced by a progressive weight loss throughout the follow-up period.⁽²³⁾

In Brazil, a cohort study that analyzed cases of MDR TB reported between 2000 and 2004

showed that the effectiveness of the treatment was 65% in the final phase of the study.⁽¹¹⁾ Our percentage of cure was 34% (considering 48 patients and 2 cases of noncompliance), and all cures occurred during the first 2 years of treatment. Since the city of Rio de Janeiro has one of the highest incidences of TB and MDR TB in the country, the lower percentage of cure reported can be related to the greater severity of the cases. The greater association between hospitalization and death was obvious. Frequent relapses, such as those that occurred in the initial phase of the treatment for TB, are related to irregular drug intake, which results in apparent cure with the maintenance of a significant number of persistent bacilli that develop again, already exhibiting resistance.⁽²⁵⁾

There is a clear contrast between the initial period of treatment for TB and the period of treatment for MDR-TB in terms of the number of patients who abandoned treatment, relapsed or presented failure. In the period of treatment for MDR-TB, 7 patients abandoned treatment, 2 of whom abandoned it permanently and 5 of whom abandoned it partially. This is due to the active search for cases of noncompliance carried out by the referral center and to the increased awareness of patients regarding the severity of MDR-TB. Only 1 patient relapsed, underwent retreatment and presented failure. The treatment routines of the referral center include a basic treatment for patients presenting treatment failure (terizidone, ofloxacin and EMB), since complete discontinuation of the drugs accelerates the progression of the disease. Given the unstable balance between the virulence of the bacillus and the immunity of the patient, promoted by drug maintenance, the patients who presented failure gradually died, and, after 8 years, the percentage of deaths was higher than the percentage of cure, only 9 patients surviving (Figure 2). The patient with the longest follow-up period (10 years in 2007) presented, in 2006, a chest X-ray with significant bilateral cavitations.

Treatment failure always brings the possibility of MDR-TB being transmitted to the families of patients, to health professionals and to the general population.^(20,26) Epidemics of MDR-TB and the dissemination of MDR strains, produced by migratory movements, have been reported in the literature. Currently, the appearance of

strains designated extensively drug resistant tuberculosis (WHO), which are defined as initially resistant to INH, RMP, a quinolone antimicrobial agent and one more injectable drug (amikacin, capreomycin or kanamycin), represents a serious threat to the world.^(22,27) Now, after a long period without investments in this domain by the pharmaceutical industry, there is the promise and the hope of new regimens or new drugs for the treatment of sensitive and resistant TB and the rescue of patients presenting failure.⁽²⁶⁾ The inclusion of drugs such as linezolid, new quinolones and capreomycin, to which TB strains are still sensitive, as well as new drugs still under research, represent the possibility of a cure for such patients, although, realistically, these new drugs will be available no earlier than 5 years from now.^(22,28)

Acknowledgments

We wish to thank the following staff members of the Professor Hélio Fraga Referral Center: Maria das Graças Ferreira Marques (social worker); Lidismar Pereira da Silva (nurse); Quilma Araujo Penna; and Débora Menezes da Silva. We would also like to thank Professor Rogério Rufino of the Department of Pulmonology of UERJ School of Medical Sciences.

References

- Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet*. 2003;362(9387):887-99.
- Glynn JR, Whitley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(8):843-9.
- Bierenbach AL, Duarte EC, Gomes AB, Souza MF. Tendência da mortalidade por tuberculose no Brasil, 1980 a 2004. *Rev Saúde Pública*. 2007;41(Supl 1):15-23.
- Hijjar MA, Procópio MJ, Freitas UM, Guedes R, Bethlem EP. Epidemiologia da tuberculose: importância no mundo, no Brasil e no Rio de Janeiro. *Pulmão RJ*. 2005;14(4):310-4.
- Mendes JM, Lourenço MC, Ferreira RM, Fonseca LS, Saad MH. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from sputum samples from symptomatic outpatients - Complexo de Mangueiras, Rio de Janeiro, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2007;33(5):579-82.
- Braga JU, Barreto AM, Hijjar MA. Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil 1995-97, IERDTB. Parte III: Principais resultados. *Boletim Pneumol Sanit*. 2003;11(1):76-81.
- Brasil. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde; Centro de Referência Professor Hélio Fraga; Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose: Uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT; 2002.
- Natal S. Emergência da resistência às drogas. *Boletim Pneumol Sanit*. 2002;10(2):57-70.
- Seiscento M, Fiuzza de Melo FA, Ido Neto J, Noronha AM, Afiume JB, Inomata T, et al. Tuberculose multirresistente (TBM): aspectos clínico-laboratoriais, epidemiológicos e terapêuticos. *J Pneumol*. 1997;21(5):237-44.
- Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. *J Pneumol*. 2004;30(supl 1):S2-S56.
- Brasil. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde; Centro de Referência Professor Hélio Fraga; Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Projeto MSH. Tuberculose Multirresistente - Guia de Vigilância Epidemiológica. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2006.
- Centro de Vigilância Epidemiológica -CVE-SES/SP [homepage on the Internet]. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo [cited 2007 Dez 28]. Tuberculose no Brasil. Available from: http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/TB/tb_mum/tb_brasil.pps
- Forbes BA, Pfyffer G, Eisenach KD. Molecular diagnosis of mycobacterial infection. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs Jr WR, editors. Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. Washington, DC: ASM Press; 2005. p. 85-98.
- Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde; Centro de Referência Prof. Hélio Fraga; Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2005.
- Selig L, Belo M, Cunha AJLA, Teixeira EG, Brito R, Luna AL et al. Óbitos atribuídos à tuberculose no Estado do Rio de Janeiro. *J Pneumol*. 2004;30(4):327-34.
- Severo NP, Leite CQ, Capela MV, Simões MJ. Clinical and demographic characteristics of patients hospitalized with tuberculosis in Brazil between 1994 and 2004. *J Bras Pneumol*. 2007;33(5):565-71.
- Albuquerque MF, Leitão CC, Campelo AR, Souza WV, Salustiano A. Prognostic factors for pulmonary tuberculosis outcome in Recife, Pernambuco, Brazil [Article in Portuguese]. *Rev Panam Salud Publica*. 2001;9(6):368-74.
- Barroso EC, Mota RM, Santos RC, Sousa AL, Barroso JB, Rodrigues JL. Fatores de risco para tuberculose multirresistente adquirida. *J Pneumol*. 2003;29(2):89-97.
- World Health Organization. Global tuberculosis control: Surveillance, planning, financing. Geneva: World Health Organization; 2007.
- Teixeira L, Perkins MD, Johnson JL, Keller R, Palaci M, do Valle Dettoni V, et al. Infection and disease among household contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001;5(4):321-8.
- Valim AR, Possuelo LG, Cafune PI, Borges M, Ribeiro MO, Rossetti ML, et al. Evaluation and genotyping of multidrug-resistant cases of tuberculosis in southern Brazil. *Microb Drug Resist*. 2006;12(3):186-91.
- Ruffino-Netto A. Recurrence of tuberculosis. *J Bras Pneumol*. 2007;33(5):xxvii-xxviii.
- Pelaquim MH, Souza e Silva R, Ribeiro SA. Factors associated with death by tuberculosis in the eastern part of São Paulo city, 2001. *J Bras Pneumol*. 2007;33(3):311-7.

62 Siqueira HR, Freitas FAD, Oliveira DN, Barreto AMW, Dalcolmo MP, Albano RM

24. Khan A, Sterling TR, Reves R, Vernon A, Hotsburgh CR. Lack of weight gain and relapse risk in a large tuberculosis treatment trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(3):344-8.
25. Picon PD, Bassanesi SL, Caramori ML, Ferreira RL, Jarczewski CA, Vieira PR. Risk factors for recurrence of tuberculosis. *J Bras Pneumol.* 2007;33(5):572-8.
26. Kritski AL, Dalcolmo MP, Souza RB, Holanda T, Gontijo PP, Fiúza de Melo F. Tuberculose entre profissionais de saúde. Risco ocupacional? *J Pneumol.* 1993;19(12):113-21.
27. Matteelli A, Migliori GB, Cirillo D, Centis R, Girard E, Ravighion M. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007;5(2):857-71.
28. Dalcolmo MP, Andrade MK, Picon PD. Tuberculose multiresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. *Rev Saúde Pública.* 2007;41(Supl 1):34-42.
29. Pablos-Mendez A, Gowda DK, Frieden TR. Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drugs: a rational framework. *Bull World Health Organ.* 2002;80(6):489-95; discussion 495-500.
30. von der Lippe B, Sandven P, Brubakk O. Efficacy and safety of linezolid in multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB)--a report of ten cases. *J Infect.* 2006;52(2):92-6.

About the authors

Hélio Ribeiro de Siqueira

Professor of Pulmonology and Phthiology, *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ. Rio de Janeiro State University – School of Medical Sciences, Rio de Janeiro, Brazil.

Flávia Alvim Dutra de Freitas

Masters Student, Genome Laboratory of the Roberto Alcântara Gomes Institute of Biology, *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ, Rio de Janeiro State University – Rio de Janeiro, Brazil.

Denise Neves de Oliveira

Biomedical Professional, Genome Laboratory of the Roberto Alcântara Gomes Institute of Biology, *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ, Rio de Janeiro State University – Rio de Janeiro, Brazil.

Angela Maria Werneck Barreto

Head of the National Referral Laboratory of Mycobacterial Study, Professor Hélio Fraga Referral Center, *Fundação Instituto Oswaldo Cruz* – Fiocruz, Oswaldo Cruz Institute Foundation – Rio de Janeiro, Brazil.

Margareth Pretti Dalcolmo

Multidrug Resistance Ambulatory Care Coordinator, Professor Hélio Fraga Referral Center, *Fundação Instituto Oswaldo Cruz* – Fiocruz, Oswaldo Cruz Institute Foundation – Rio de Janeiro, Brazil.

Rodolpho Mattos Albano

Head of the Genome Laboratory of Roberto Alcântara Gomes Institute of Biology, *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ, Rio de Janeiro State University – Rio de Janeiro, Brazil.

ANEXO D - Métodos moleculares no diagnóstico da tuberculose e na resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas

Freitas FAD, Siqueira HR, Albano RM. Métodos moleculares na tuberculose e resistência do *Mycobacterium tuberculosis*:

Curso de temas avançados de tuberculose - aula 12

Métodos moleculares no diagnóstico da tuberculose e na resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas.

Molecular methods in diagnosis of tuberculosis and resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to drugs.

Flávia A. D. de Freitas¹, Helio R. de Siqueira², Rodolpho M. Albano¹.

RESUMO

A tuberculose, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, é a doença infecto-contagiosa, produzida por um único microorganismo, que mais causa óbitos de indivíduos adultos no mundo. O objetivo deste artigo é revisar a metodologia para a identificação do *Mycobacterium tuberculosis* e analisar a resistência aos medicamentos isoniazida e rifampicina, no tratamento desta doença, por métodos de biologia molecular que são cada vez mais utilizados, por sua grande sensibilidade e especificidade, apesar do custo ser ainda elevado.

Descritores: tuberculose, diagnóstico, biologia molecular.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infection contagious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* and has been described as the main responsible by adult death, by the only one microorganism, in the World. The aim of this article is a review of methodology to identify the *Mycobacterium tuberculosis* and to analyze the resistance for isoniazid and rifampicin by biological and molecular methods, which have been used more frequently due to high sensibility and specificity, in spite of their high price.

Keywords: tuberculosis, diagnosis, molecular biology.

INTRODUÇÃO

Atualmente a tuberculose (TB) é a doença infecto-contagiosa, causada por um único microorganismo, o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) que mais causa óbitos de indivíduos adultos no mundo. Estima-se que, nesta década, ocorrerão mais de 80 milhões de novos casos e 20 milhões de óbitos. A maioria destes pacientes encontra-se em países do terceiro mundo, onde a associação de políticas inadequadas de saúde pública e uma situação socioeconômica desfavorável contribui para a manutenção deste flagelo. Com a pandemia do HIV/AIDS, os países do primeiro mundo

também tiveram um aumento no número de casos da doença, com a transmissão ocorrendo, principalmente, em hospitais e prisões.¹

Com exceção das quinolonas, antibiótico inicialmente desenvolvido para combater infecções por germes comuns, mas que tem poder bactericida sobre o Mtb, há mais de 40 anos não surge um novo medicamento para o tratamento da TB, enquanto a resistência primária vem aumentando gradativamente no mundo, com o surgimento de multirresistência (MR) – resistência, pelo menos, à isoniazida (INH) e à rifampicina (RMP) - e de TB-XDR - TB MR

1. Laboratório de Genoma, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

2. Disciplina de Pneumologia e Fisiologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Trabalho realizado no Laboratório de Genoma, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Não há conflito de interesses.

Endereço para correspondência: Helio Ribeiro de Siqueira, Rua Pontes Correa, 38, apto. 501, Tijuca, CEP 20510-050, Rio de Janeiro RJ, Brasil. Tel: 55 21 2208-0015. E-mail: drhelio@infolink.com.br.

Recebido em 22/03/2009 e aceito em 30/06/2009, após revisão.

com resistência associada a uma quinolona e a um medicamento injetável (amicacina, canamicina ou capreomicina). Estes fatos trazem a necessidade de se diagnosticar rapidamente os casos MR para uma terapia eficaz.

MÉTODOS CONVENCIONAIS DE DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE E DE RESISTÊNCIA

Com o aumento progressivo da resistência primária no mundo, a cultura para micobactérias e o teste de sensibilidade aos medicamentos deveriam ser realizados já no início do tratamento. Mas estes exames se tornam muito importantes, diríamos obrigatórios, nos casos em que a baciloscopia do escarro permanece positiva após o segundo mês de tratamento, ou negativa inicialmente e positiva, a seguir, durante o tratamento. A mesma necessidade de cultura e teste de sensibilidade tem que ser considerada nos casos de recidiva, de contato com pessoas com suspeita de terem TB resistentes, de pacientes HIV que adquirem TB em ambiente hospitalar, de presos ou de pessoas em abrigos e de profissionais de saúde que adoecem.

Os testes de sensibilidade aos fármacos utilizados no tratamento requerem o isolamento do *M. tuberculosis* do espécime clínico em um meio de cultura adequado, como o de Löwenstein-Jensen e Ogawa. Essa etapa de isolamento do bacilo é bastante lenta (três a seis semanas). Vários métodos podem ser utilizados para testar a sensibilidade do *M. tuberculosis*, sendo o das proporções o mais empregado.² Os resultados desse método são reportados como a porcentagem do total da população bacteriana resistente a um determinado fármaco. Isto é definido pela quantidade do crescimento no meio de cultura contendo o fármaco, quando comparado ao crescimento em meio sem o fármaco. Este método necessita de 28 dias para ser concluído (após a cultura inicial), tempo por demais dilatado para uma decisão clínica. Métodos alternativos e mais rápidos também podem ser utilizados como MODS - observação microscópica da sensibilidade às drogas - que detecta precocemente o crescimento do *M. tuberculosis* em meio líquido e determina o teste de sensibilidade (mas com risco de contaminação do profissional durante o procedimento) e o método Alamar Blue, que é um corante indicador que mede a proliferação da micobactéria, quantitativamente, através da oxidação-redução (REDOX), produzindo uma mudança colorimétrica.

O teste de sensibilidade para isolados de *M. tuberculosis* também pode ser realizado por técnicas automatizadas, como o sistema BACTEC MGIT 960 (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*). Esse método pode reduzir o tempo de identificação dos microrganismos resistentes aos fármacos para três semanas, mas é dispendioso para uso hospitalar de rotina.²

MÉTODOS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE

Os mecanismos genômicos associados à multirresistência do *M. tuberculosis* geralmente envolvem mutações nos genes que codificam determinadas proteínas, que são inibidas pelas drogas ou que as metabolizam. As mutações podem produzir trocas de aminoácidos, que geram uma proteína com menos atividade ou afinidade pela droga, ou modificar a ação dos promotores dos genes, alterando a expressão gênica. Cada droga apresenta, pelo menos, uma proteína envolvida em seu metabolismo, que pode ser modificada por mutações genéticas. Através de métodos moleculares, estas mutações podem ser detectadas com rapidez, alta sensibilidade e especificidade.

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é a técnica onde uma curta região de um gene, de um determinado DNA, é copiada muitas vezes por uma enzima DNA polimerase. As seqüências de nucleotídeos das extremidades da região a ser amplificada devem ser conhecidas para que dois pequenos oligonucleotídeos (iniciadores) possam hibridizar (se ligar) com a molécula de DNA, cada um com uma das fitas da dupla hélice (Figura 1).

Para iniciar uma amplificação por PCR, prepara-se uma mistura (mix) com os quatro tipos de nucleotídeos (dNTPs), magnésio, enzima DNA polimerase, tampão da enzima e os oligonucleotídeos. Em seguida, essa mistura é aquecida a 95°C para a desnaturação (separação) da dupla fita do DNA. Assim, cada fita de DNA-molde fica livre para, em uma temperatura mais baixa, os iniciadores se hibridizarem, permitindo que a DNA polimerase sintetize as novas fitas complementares. Em um novo ciclo, a mistura é então reaquecida a 95°C, para que as fitas recém-sintetizadas se separem (desnaturação) e resfriadas, permitam que mais iniciadores se hibridizem com estas fitas, repetindo-se os ciclos com a formação de outras fitas complementares. As reações de PCR se fazem de maneira exponencial e, em uma reação de 35 ciclos, por exemplo, ocorrem $2^{35} = 2^{10} = 68$ bilhões de cópias (amplicons) da região desejada do gene. O resultado da reação é lido por eletroforese em gel de agarose. Atualmente a técnica de PCR em tempo real (RT PCR) executa as reações e reproduz o resultado automaticamente. Esta sigla é muitas vezes confundida com a técnica de transcriptase reversa PCR usada para amplificar fitas de RNA.

A PCR tem sido amplamente utilizada em biologia molecular, devido a sua rapidez e eficácia. Para o diagnóstico de TB em material de escarro, esta técnica possui média sensibilidade (65%) e grande especificidade (acima de 90%), e pode ser realizada em algumas horas. Algumas limitações são a possibilidade de contaminação da amostra (o que pode gerar um resultado falso positivo), a

presença de proteínas inibidoras da reação (o que geraria um resultado falso negativo) e o custo desta metodologia, que ainda é elevado. A sensibilidade do método se prende, ainda, ao número de bacilos presentes no es-

carro. Quando o escarro é positivo na pesquisa de BAAR (presença de 5 mil a dez mil bacilos por mililitro), a reação de PCR é positiva e sua sensibilidade cai com o menor número de bacilos existentes no material analisado.

A. Cadeia de aminoácidos codificada (parte de uma proteína) e códons

1					5					10
GTC	CCC	GAG	AGC	CAC	CCA	CCC	ATT	ACA	CGA	
Valina	Prolina	Ac. Glutâmico	Serina	Histidina	Prolina	Prolina	Isoleucina	Treonina	Arginina	

B. PCR

Oligonucleotídeos (Primers) da PCR. Suponhamos a amplificação de um pequeno segmento do DNA.

O aquecimento no início de cada reação separa as fitas de DNA (desnaturação).

O oligonucleotídeo senso vai ser igual ao início da fita superior do DNA 5' GTGCCCGAGCAAC 3' que vai se anelar com o início da fita inferior, para dar início a uma nova dupla fita.

O oligonucleotídeo anti-senso vai ser o complemento da fita superior, no limite da região amplificada 3' GTGGCCTCGGCGA 5' que vai se anelar com a fita superior, para dar início a uma nova dupla fita

```

5' GTGCCCGAGAGCCACCCACCCATTACAGAAACCACCACCGGAGCCGCT 3'
                                     ← 3' GTGGCCTCGGCGA 5'
5' GTGCCCGAGAGCC 3' →
3' CACGGGCTCTCGGGTGGGTAATGTCTTTGGTGGTGGCCTCGGCGA 5'

```

Conforme nomenclatura internacional, os oligonucleotídeos são descritos no sentido 5' → 3'

Oligonucleotídeo senso
5' GTGCCCGAGAGCC 3'

Oligonucleotídeo anti senso.
5' AGCGGCTCCGGT 3'

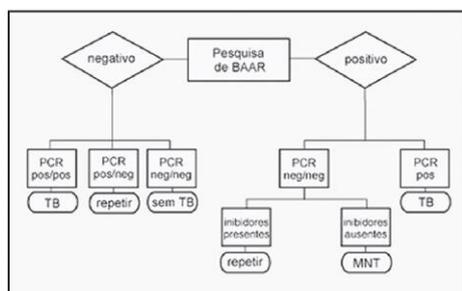
A. cadeia de aminoácidos codificada. Cada três nucleotídeos codifica um aminoácido.

B. PCR - exemplo de escolha dos oligonucleotídeos. Tendo-se apenas a fita superior, o oligonucleotídeo anti-senso vai ser o inverso do seu complemento. A seguir mostra-se a amplificação por PCR de um segmento do gene.

Figura 1 – Cópias do fragmento de DNA desejado (*amplicons*).

Para otimização do diagnóstico de tuberculose pela PCR, e para que sejam minimizadas as possibilidades de resultados falso negativos ou positivos, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) padronizou e publicou um quadro de regras a serem seguidas (Figura 2). Como pode ser observado, se a pesquisa BAAR de um paciente apresentar resultado negativo, devem ser realizadas duas PCRs. Sendo os dois resultados positivos, o diagnóstico de tuberculose é determinado; sendo um positivo e outro ne-

gativo, é necessário que se repita o procedimento e sendo os dois negativos, o diagnóstico de TB é descartado. Entretanto, se a pesquisa de BAAR apresentar resultado positivo, e a reação de PCR for positiva, confirma-se o diagnóstico específico de *Mycobacterium tuberculosis* e sendo negativa, a PCR é repetida. Esta segunda PCR, ao apresentar novamente resultado negativo, aponta para duas possibilidades: a presença de inibidores na reação ou a presença de *Mycobacterium não tuberculosis* no paciente.



TB – diagnóstico de tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*).
MNTB – *Mycobacterium* não tuberculosis.

Figura 2 – Quadro de regras do CDC para diagnóstico da tuberculose por PCR.

Além da reação em cadeia da polimerase *in house*, existem kits comerciais para o diagnóstico da tuberculose. Dentre os kits existentes, apenas o AMTD, o Amplicor e o EMTD foram aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*), para amostras respiratórias em baciloscopia positiva, e apenas o EMTD foi aprovado para amostras com baciloscopia negativa.

DIAGNÓSTICO DE MULTIRRESISTÊNCIA POR BIOLOGIA MOLECULAR

Ao contrário da resistência à RMP, em que a maioria das mutações se concentra em uma pequena faixa 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%).⁴

O gene *katG* codifica a enzima catalase-peroxidase, importante no metabolismo do bacilo.⁵ Esta enzima ativa a INH, que é uma pré-droga, 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.^{6,7} A mutação mais comum no gene *katG* surge no códon 315 (Figura 3) pela substituição do aminoácido serina (AGC) por treonina (ACC), com diminuição da ação catalase, o que resulta em resistência à INH.⁸ 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 – liga-se à NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e impede a atividade da enzima, resultando na morte da bactéria, por interferência na síntese dos ácidos micólicos.⁹ A mutação estrutural do gene *inhA* faz com que a enzima modificada perca afinidade pela NADH e a bactéria se torna resistente à INH.¹⁰

```

301          310          320
aag agc tcg tat ggc acc gga acc ggt aag gac gcg atc acc age ggc atc gag gtc gta
Lys Ser Ser Ser Gly Thr Gly Thr Gly Lys Asp Ala Ile Thr Ser Gly Ser Glu Val Val

```

A marcação em negrito indica o códon 315 onde ocorre o maior número de mutações que produzem mudança do aminoácido agc serina por acc treonina e resistência à INH. Aminoácidos: Lys – lisina; Ser – serina; Gly – glicina; Thr – treonina; Asp – ácido aspártico, Ala – alanina; Ile – isoleucina; Glu – ácido glutâmico; Val – valina. O gene *katG* tem 2224 nucleotídeos. E 741 códons.

Figura 3 – Gene *katG*: códons de 301 a 320.

```

gcg atc aag gag ttc ttc ggc acc agc cag ctg agc caa ttc atg gac cag aac aac ccg
501          505          510          515          520
ctg tcg ggg ttg acc cac aag cgc cga ctg tcg ggc ctg ggg ccc ggc ggt ctg tca cgt
521          525          530 (Ser)          535          540

```

Os códons 507 e 533 (setas) delimitam a região *hot-spot*. O códon 531 (serina) é o que sofre maior número de mutações, que se traduzem em resistência à RMP.

Figura 4 – Pequena parte do gene *rpoB*.

Sequenciamento de genes

O sequenciamento do gene, para o diagnóstico de mutações, realiza-se com a reação de PCR, numa fase anterior, que delimita a região a ser analisada. A região delimitada produz uma seqüência de nucleotídeos, que é alinhada com a seqüência de referência para o *M. tuberculosis*, para a determinação das mutações e, conseqüentemente, da resistência específica a um fármaco. O sequenciamento depende de aparelhos caros e a técnica é trabalhosa, embora os resultados sejam altamente confiáveis e possam ser utilizados como “padrão ouro” para o desenvolvimento de métodos de biologia molecular, para o diagnóstico de mutações de forma mais rápida e simples.

Testes rápidos em biologia molecular para o diagnóstico de mutações

O método INNO-LiPA Rif. TB é específico para a RMP e identifica as mutações mais comuns na RRDR.^{15,16} Os métodos *Genotype MTBDR Assay* e *Real-Time PCR* diagnosticam mutações tanto na RRDR quanto no códon 315 do gene *katG*.^{17,18,19} Estes métodos dependem

de kits, que também são de alto custo para uso em instituições públicas. O método MTBDR-plus é capaz de diagnosticar as mutações mais frequentes nos genes *rpoB* e *katG*, e vem sendo recomendado pela Organização Mundial de Saúde por ser menos dispendioso e analisar 40 amostras simultaneamente. Mokrousov e colaboradores²⁰ utilizaram, em seu trabalho, a técnica de PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism), que usa a enzima de restrição HAPII para diagnosticar a mutação no códon 315 (Serina AGC para Treonina ACC). Este método tem sido importante como um marcador de resistência para a INH, no noroeste da Rússia, por ser rápido, ter baixo custo, apresentar manipulação simples e ser fácil de interpretar. O método requer, apenas, aparelhagem padrão de PCR e de eletroforese. Novas pesquisas precisam ser realizadas para avaliar melhor esta técnica.

IS6110-RFLP

O IS6110-RFLP (restriction fragment length polymorphism) possibilita uma análise genotípica e, conseqüentemente, o entendimento da epidemiologia da tuberculose. A seqüência de inserção IS6110 está presente no genoma de muitas cepas do complexo *M. tuberculosis*, em um número variável de cópias. A análise por RFLP com o IS6110 provou ser um conveniente e confiável método para diferenciação de cepas de *M. tuberculosis*, sendo considerado o método de "padrão-ouro" na genotipagem molecular do *M. tuberculosis*, com um alto poder discriminatório.²¹

Resumidamente, esta técnica consiste na digestão das amostras isoladas de DNA, através de uma endonuclease de restrição. Esta enzima cliva o DNA em um sítio específico, e cada seqüência IS6110 apresenta apenas um sítio de restrição para esta enzima. Como esta seqüência apresenta-se em número variável e em múltiplas cópias no genoma do *M. tuberculosis*, o pa-

drão de bandas gerado pela digestão permitirá a divisão das amostras analisadas em *clusters*.

Método de Spoligotyping

A técnica de tipagem molecular pelo Spoligotyping é uma técnica baseada em PCR, com a possibilidade de utilização de menor quantidade de DNA. Este procedimento, além de ser mais rápido, facilita a investigação epidemiológica em tempo real, tornando mais rápida a tipagem molecular. O Spoligotyping, no qual avalia-se o polimorfismo presente no locus DR (Direct Repeat) encontrado exclusivamente no genoma das micobactérias do complexo *M. Tuberculosis*, tem sido utilizado em diversos estudos filogenéticos.²²

Uma particularidade do Spoligotyping é classificar as cepas de *M. tuberculosis* em determinadas famílias, de acordo com o padrão encontrado.²³ Através desta técnica, foram determinadas as famílias predominantes em nível mundial - Beijing, LAM (Latin-American and Mediterranean), Haarlem e T - sendo mais encontradas, na Ásia, as cepas Beijing e, na Europa e Américas, as cepas LAM.²⁴

PRA - PCR para identificação de espécies e subespécies de micobactérias

O PRA - PCR consiste na análise do padrão de restrição (PRA - Restriction Enzyme Pattern Analysis) de produtos da amplificação de um fragmento de 439 pares de bases do gene *hsp65*. Após a amplificação deste gene, é realizada a restrição dos fragmentos amplificados, através da digestão com as enzimas *BstII* e *HaeIII*. A interpretação do padrão de bandas gerado por esta digestão permite a identificação de espécies e subespécies de micobactéria. Esta técnica possui alta acurácia, sendo mais rápida e menos dispendiosa que a identificação fenotípica convencional, realizada por meio de reações químicas.

REFERÊNCIAS

- Baptista, I, Colemann, M., et al. 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. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97:1147-52.
- Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Ordenação de Pneumologia Sanitária. Manual de normas para o controle da tuberculose. 4ª ed. Brasília (DF): Fundação Nacional da Saúde; 1995.
- Rossetti MI, Vallim AR, Silva MS, Rodrigues VS. Tuberculose resistente: revisão molecular. Rev Saúde Pública 2002;36(4):325-32.
- Höfling CC, Pavan FM, Giampaglia CMS, Ferrazoli I, Ally 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.
- 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 isoniazid resistance. Molecular Microbiology 1996;22(3):583-92.
- Ramaswami S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Update. Tuberc Lung Dis 1998;79(1):3-29.
- Slayden RA, Barry C. The genetic and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Microbes and Infection 2000;2(6):659-69.
- 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.
- 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.
- Basso LA, Zhang P, Musser JM, Jacobs WR, Blanchard JS. Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymatic Characterization of enoI reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. J Infect Dis 1998;178(3):769-75.
- Somoskóvi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Resp Res 2001;2(3):161-8.
- Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. Antimicrobial Agents Chemoth 2002;46(2):261-74.
- Ilani 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.
14. Williams D, Waguespack C, Eisenach K. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(10):380-6.
 15. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijls W, Jannes G, De Rijck P, et al. Evaluation of the INNO-LiPA Rif TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(10):2093-8.
 16. Mäkinen J, Marttila HJ, Marjamäki M, Viljanen MK, Soini H. Comparison of two commercially available DNA Line Probe Assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clinical Microbiology* 2006;44(2):350-352.
 17. Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, Soyler I. Evaluation of the genotype MTDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clinical Microbiology* 2006;44(7):2338-42.
 18. Viedma DG, Infantes MSD, Lasala F, Chaves F, Alcalá L, Bouza E. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002;40(5):988-95.
 19. Hilleman D, Rüsche-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the Geno Type MTDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40(8):2635-40.
 20. Mokroutsov I, Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, Steklova L, Vyshnevskiy B. High prevalence of katG ser315Hr substitution among isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(5):1417-21.
 21. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406-9.
 22. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35:207-14.
 23. Filii I, et al. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1347-9.
 24. Filii I, et al. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol* 2003;41:1963-70.