



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Bianca Porphirio da Costa

**Detecção rápida de resistência aos fármacos de segunda linha
(fluroquinolonas, amicacina e canamicina) em cepas de
Mycobacterium tuberculosis, utilizando o método
*Multiplex allele-specific – PCR (MAS-PCR)***

Rio de Janeiro

2016

Bianca Porphirio da Costa

Detecção rápida de resistência ao fármacos de segunda linha (fluroquinolonas, amicacina e canamicina) em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, utilizando o método *Multiplex allele-specific* – PCR (MAS-PCR)

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Siqueira

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Redner

Rio de Janeiro

2016

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

C837 Costa, Bianca Porphirio da

Detecção rápida de resistência aos fármacos de segunda linha (fluroquinolonas, amicacina e canamicina) em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando o método *Multiplex allel-specific* – PCR (MAS-PCR) / Bianca Porphirio da Costa – 2016.

54 f.

Orientador: Hélio Siqueira

Coorientador: Paulo Redner

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Tuberculose - Teses. 3. Amicacina. 4. Canamicina. 5. Fluoroquinolonas. I. Siqueira, Hélio. II. Redner, Paulo. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. 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

Bianca Porphirio da Costa

Detecção rápida de resistência aos fármacos de segunda linha (fluroquinolona, amicacina e canamicina) em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, utilizando o método *Multiplex allele-specific* – PCR (MAS-PCR)

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

Aprovada em 30 de junho de 2016.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Siqueira
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Redner
Fundação Oswaldo Cruz

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Thaís Porto Amadeu
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Prescilla Emay Nagao Ferreira
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Fátima Cristina Onofre Fandinho Montes
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2016

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Gostaria de agradecer a minha família, por acreditar em mim e que com muito carinho me apoiaram em tudo na minha vida.

Ao meu orientador Dr Hélio, que acreditou que minha pesquisa valia a pena e apostou em mim e na instituição em que trabalho.

Ao meu orientador Dr Paulo Redner, que teve a paciência de me ajudar em cada fase da pesquisa, que me acalmava em cada momento de pânico quando algum experimento não funcionava. Por ser uma das melhores pessoas que conheço, uma das mais bondosas e com um coração gigante, que está sempre disposto a ajudar qualquer um. Quero expressar minha admiração e respeito pelo profissional e pela pessoa que é.

Ao meu amigo Paulo Caldas, que me deu a ideia para o projeto e que desde então também me orientou em várias fases da pesquisa.

Aos meus amigos e colega de trabalho Nicole Victor Ferreira, Lusiano Motta, Luane Distasio e Aline Campelo que me ajudaram a sequenciar todas as amostras e a resolver problemas durante o caminho.

A todos meus amigos que de forma especial e carinhosa me deram força, me apoiando nos momentos de dificuldades, preocupando-se até com os problemas pessoais pelos quais passei durante esse período.

A Dra. Fátima Cristina Onofre Fandinho Montes, chefe do Laboratório de Referência Nacional de Bacteriologia da Tuberculose e Micobactérias Ângela Maria Werneck do Centro de Referência Professor Hélio Fraga/ENSP/FIOCRUZ, pela sua amizade, seus incentivos, atenção, credibilidade em permitir a realização deste trabalho e por toda a orientação que me deu em todos esses anos que nos conhecemos.

Nosso maior medo não é o de sermos incapazes. Nosso maior medo é descobrir que somos muito mais poderosos do que pensamos. É a nossa luz e não nossas trevas, aquilo que mais nos assusta. Vivemos nos perguntando: quem sou eu, que me julgo tão insignificante, para aceitar o desafio de ser brilhante, sedutora, talentosa, fabulosa? Na verdade, por que não?...

Marianne Williamson

RESUMO

COSTA, Bianca Porphirio da. **Detecção rápida de resistência aos fármacos de segunda linha (fluroquinolonas, amicacina e canamicina) em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando o método *Multiplex allele-specific* – PCR (MAS-PCR)**. 2016. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A tuberculose mantém-se como uma das principais causas de morte, provocadas por um único agente infeccioso, em todo o mundo. Deficiências no processo de detecção da doença, assim como falência de alguns procedimentos terapêuticos (por exemplo, em função do abandono do tratamento por parte do paciente), tem contribuído para o surgimento de bactérias resistentes a um ou mais antibióticos (MDR – resistência a múltiplas drogas, e XDR – extensivamente resistente a drogas), constituindo um problema grave e uma verdadeira ameaça aos programas de controle da tuberculose. Este estudo teve como objetivo identificar com rapidez cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) resistentes as fluoroquinolonas (FLQs), à amicacina (AMK) e à canamicina (KAN) por mutações pontuais nos genes *gyrA* (códon 94) e *rrs* (códon 1401), respectivamente. A metodologia utilizada foi o MAS-PCR (*Multiplex allele-specific* - PCR) que se baseia na amplificação por PCR e na detecção simultânea de mutações pontuais mais frequentemente associadas à resistência aos fármacos FLQs, AMK e KAN em cepas de MTB. Cem cepas de *M. tuberculosis* pertencentes ao acervo do Laboratório de Referência Nacional de Tuberculose CRPHF/ENSP/FIOCRUZ foram analisadas pelo método MAS-PCR, e comparadas aos resultados obtidos previamente pelo método bacteriológico e automatizado BACTEC MGIT 960. Os resultados mostraram discordância entre o método molecular MAS-PCR e o método fenotípico MGIT 960 (42% no gene *gyrA* e 32% no gene *rrs*). Os resultados discordantes foram analisados pela análise de sequenciamento, mostrando que a sensibilidade do método MAS-PCR com o gene *gyrA* foi de 71,4% e com o gene *rrs* foi de 52,5%. O baixo valor de sensibilidade foi devido ao fato de que algumas cepas resistentes não apresentaram mutação na posição analisada pelo MAS-PCR, o que pode significar que as cepas de MTB resistentes presentes no Brasil têm uma singularidade no padrão de mutações, diferente do descrito no resto do mundo.

Palavras-chave: MAS-PCR. *M. tuberculosis*. MGIT. Amicacina. Canamicina. Ofloxacina. Fluoroquinolonas.

ABSTRACT

COSTA, Bianca Porphirio da. **Rapid detection of resistance to second-line drugs (fluoroquinolones, amikacin and kanamycin) in *Mycobacterium tuberculosis* strains by using the *Multiplex allele-specific – PCR* (MAS-PCR).** 2016. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Tuberculosis remains one of the main causes of death caused by a single infectious agent worldwide. Deficiencies in the disease detection process as well as failure of some therapeutic procedures (e.g., due to the abandonment of the treatment by the patient) has contributed to the emergence of bacteria resistant to one or more antibiotics (MDR - multidrug resistance and XDR - extensively drug-resistant), constituting a serious problem and a real threat to tuberculosis control programs. This study aims to quickly identify strains of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) resistant to fluoroquinolones (FLQs), amikacin (AMK) and kanamycin (KAN) by point mutations in *gyrA* genes (codon 94) and *rrs* (codon 1045), respectively. The methodology used was the MAS-PCR (Multiplex Allele-Specific - PCR) which is based on PCR amplification and simultaneous detection of point mutations most frequently associated with resistance to FLQs, AMK and KAN in MTB strains. One hundred *M. tuberculosis* strains belonging to the collection of National Reference Laboratory for Tuberculosis / CRPHF / ENSP / FIOCRUZ were analyzed by MAS-PCR method and compared to the results obtained previously by bacteriological and automated method BACTEC MGIT 960. The results showed disagreement between the MAS-PCR molecular method and phenotypic method MGIT 960 (42% in the *gyrA* gene and 32% in the *rrs* gene). The discordant results were analyzed by sequence analysis, showing that the sensitivity of the MAS-PCR method with the *gyrA* gene was 71.4% and the *rrs* gene was 52.5%. The low value of sensitivity is due to the fact that some resistant strains showed no mutation at the position analyzed by MAS-PCR, which may mean that the resistant MTB strains present in Brazil have a singularity in the pattern of mutations, other than described in the rest of the world.

Keywords: MAS-PCR. *M. tuberculosis*. MGIT. Amikacin. Kanamycin. Ofloxacin. Fluoroquinolones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Países com maiores taxas de prevalência de tuberculose.....	14
Quadro 1 –	Genes envolvidos na resistência aos fármacos antituberculose.....	23
Figura 2 –	Fluxograma do estudo.....	28
Figura 3 –	Desenho dos <i>primers</i> do gene <i>gyrA</i>	30
Figura 4 –	Desenho dos <i>primers</i> do gene <i>rrs</i>	31
Figura 5 –	Corrida eletroforética do MAS-PCR de ambos os genes.....	37
Figura 6 –	Fluxograma da rotina laboratorial para detecção de resistência a antibióticos em isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> preconizado pelo Ministério da Saúde	49
Figura 7 –	Sugestão de um novo fluxograma da rotina laboratorial para detecção de resistência a antibióticos em isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Análise comparativa entre os métodos de MGIT, MAS-PCR e sequenciamento no gene <i>gyrA</i>	38
Tabela 2 –	Análise comparativa dos resultados obtidos no MAS-PCR para o gene <i>gyrA</i> (posição 94) e a resistência observada no MGIT.....	41
Tabela 3 –	Análise comparativa dos resultados obtidos no MAS-PCR (<i>gyrA</i>) junto com sequenciamento e a resistência observada no MGIT.....	41
Tabela 4 –	Análise comparativa parcial entre os métodos de MGIT, MAS-PCR e sequenciamento no gene <i>rrs</i>	42
Tabela 5 –	Análise comparativa dos resultados obtidos no MAS-PCR (<i>rrs</i>) e a resistência observada no MGIT.....	45
Tabela 6 –	Análise comparativa dos resultados obtidos no MAS-PCR (<i>rrs</i>) junto com sequenciamento e a resistência observada no MGIT.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABF	Azul de Bromo Fenol
AM	Amazonas
AMK	Amicacina
BCG	Bacilo Calmette Guérin
BK	Bacilo de Koch
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAP	Capreomicina
CRPHF	Centro de Referência Professor Hélio Fraga
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
EMB	Etambutol
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
FLQ	Fluroquinolona
GU	<i>Growth Unit</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INH	Isoniazida
KAN	Canamicina
LJ	Löwenstein-Jensen
MAS-PCR	<i>Multiplex allele-specific - PCR</i>
MDG	<i>Millennium Development Goals</i>
MDR	Multidroga Resistente
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
MNT	Micobactéria não causadora de tuberculose
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MUT	Mutado
MW	Peso Molecular
OFLO	Ofloxacina

OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	Ácido Para-aminosalicílico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Pernambuco
RIF	Rifampicina
RIPE	Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol
RJ	Rio de Janeiro
rRNA	RNA ribossomal
RS	Rio Grande do Sul
SDG	<i>Sustainable Development Goals</i>
SITETB	Sistema de Informação de Tratamentos Especiais de Tuberculose
SM	Estreptomicina
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TBE	Tampão Borato EDTA
TRM	Teste Rápido Molecular
TSA	Teste de Sensibilidade
UV	Ultra Violeta
WT	<i>Wild Type</i>
XDR	Extensivamente Resistente

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°	Grau
µm	Micrômetro
^a	Ordinal Indicador Feminino
®	Símbolo de Registrado
mL	Militro
µL	Microlitro
rpm	Rotação por minuto
x	Vezes (concentração)
mM	Micromolar
U	Unidade
cm	Centímetro
ng	Nanograma
bp	Pares de Base
-	Menos (negatividade)
pmoles	Picomoles
+	Soma (positividade)
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
seg	Segundo
min	Minuto

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	JUSTIFICATIVA	26
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo geral	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Fluxograma	28
3.2	Amostras do Estudo	29
3.3	Teste de Sensibilidade pelo Sistema BACTEC MGIT 960	29
3.4	<i>Multiplex Allele-Specific</i> – PCR (MAS-PCR)	29
3.4.1	<u>Isolamento de DNA</u>	29
3.4.2	<u>Amplificação parcial por PCR do genes <i>gyrA</i> e <i>rrs</i></u>	30
3.4.3	<u>Corrida Eletroforética</u>	31
3.5	Sequenciamento	32
3.5.1	<u>Reação da PCR – Amplificação dos genes <i>gyrA</i> e <i>rrs</i></u>	32
3.5.2	<u>Purificação dos produtos da PCR</u>	32
3.5.3	<u>Reações da PCR para Sequenciamento</u>	32
3.5.4	<u>Precipitação da Reação de Sequenciamento</u>	33
3.5.5	<u>Desnaturação</u>	33
3.5.6	<u>Análise de Sequências</u>	33
3.6	Análise estatística	34
4	CONSIDERAÇÕES DE BIOSSEGURANÇA	35
5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	36
6	RESULTADOS	37
7	DISCUSSÃO	46
	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa, causada por um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), conhecido também como bacilo de Koch (BK).

a) *Mycobacterium tuberculosis*

O *M. tuberculosis* foi identificado pelo alemão Robert Koch que, no ano de 1882, tornou pública sua descoberta em uma reunião na “Physiological Society” em Berlim (Alemanha) e, por isso, também é chamado de bacilo de Koch. A partir de então, Robert Koch juntou-se a dois grandes nomes da microbiologia moderna: Louis Pauster e Gerhard Armauer Hansen e, desde então, a tuberculose é uma das doenças mais estudadas em todo o mundo (Trabulsi *et al.*, 1999).

O MTB é uma bactéria intracelular facultativa que se prolifera inicialmente nos pulmões (células macrofágicas dos alvéolos pulmonares) e a partir destes pode se difundir para diversas partes do organismo humano, podendo causar tuberculose extrapulmonar (atingindo ossos, cérebro, nódulos linfáticos e outros tecidos). Possui longo período de geração (18 a 24 horas) e tem um tempo de crescimento médio de 3 a 4 semanas em meio de cultivo a base de ovo, meio Löwenstein-Jensen (LJ), em temperatura de 35-37°C. O bacilo pode se disseminar pelo ar através de aerossóis expelidos pela tosse, fala ou espirro (Brasil, 2008). O *M. tuberculosis* é um bacilo reto ou ligeiramente curvo, imóvel, não esporulado, não encapsulado, que mede de 1 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura, sendo a propriedade morfotintorial da álcool-ácido resistência, a mais importante. Esta propriedade se refere à capacidade dos componentes desse gênero em resistir ao descoramento com solução de álcool etílico a 95% e de ácido clorídrico (solução álcool-ácida) a 3% durante o processo de coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (Brasil, 2008). A parede celular das espécies deste gênero é constituída principalmente por ácidos micólicos, formando uma barreira hidrofóbica que confere resistência à dessecação, à descoloração por álcool e ácido e a diversos agentes químicos e antibióticos.

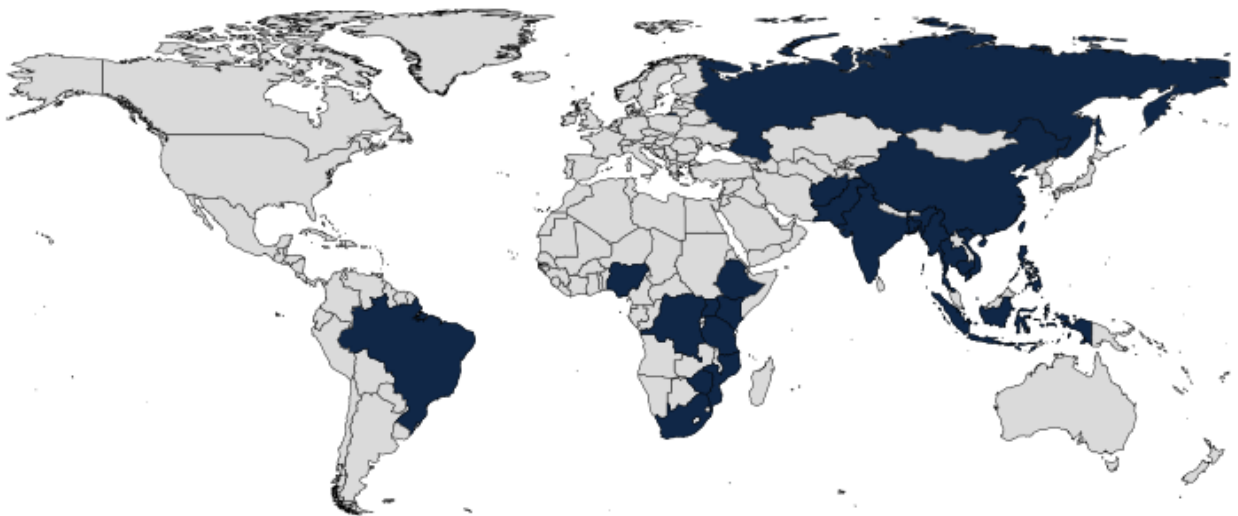
Outra peculiaridade importante é o agrupamento dos bacilos em forma de ramos alongados e tortuosos, conhecidos como cordas, visualizados após crescimento em cultura líquida, o que pode ser utilizada como indicação de que se trata da bactéria do complexo *M. tuberculosis* (Campos, 2006).

b) Epidemiologia da tuberculose

A tuberculose é uma das principais doenças a serem enfrentadas no Brasil e no mundo, pois está associada com a pobreza, a marginalização de parte da população e a falta de serviços públicos (Ministério da Saúde, 2014).

No plano internacional, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que 22 países concentram cerca de 83% dos casos de tuberculose (Figura 1). Atualmente, o Brasil faz parte desse grupo, ocupando a 16ª posição em número absoluto de casos; onde Índia, Indonésia, China, Nigéria, Paquistão e África do Sul são os países com maior índice da doença. Ao ser considerado o coeficiente de incidência, o Brasil ocupa a 22ª posição entre esses países e ocupa a 18ª posição em carga de tuberculose, representando 0,9% dos casos estimados no mundo e 33% dos estimados para as Américas (WHO, 2015).

Figura 1 - Países com maiores taxas de prevalência de tuberculose



Legenda: Mapa evidenciando em azul os países com maiores taxas de prevalência tuberculose, os quais em conjunto possuem aproximadamente 80% do total de casos no mundo.

Fonte: Kaiser Family Foundation, 2015.

Em 1993, a OMS declarou a TB como uma emergência de saúde pública mundial, em um momento em que surgiram entre 7-8 milhões de novos casos e 1,3-1,6 milhão de mortes a cada ano. Em 2010, havia cerca de 9,2 milhões de novos casos e 1,5 milhão de mortes (incluindo mortes por tuberculose em casos HIV-positivo) (WHO, 2011).

Apesar da disponibilidade de um tratamento altamente eficaz, a tuberculose continua sendo um importante problema de saúde global. Apesar disso, a doença ainda se configura como uma emergência global: estima-se que, em 2014, 9,6 milhões de pessoas adoeceram com tuberculose, das quais 12% eram HIV-positivo. Houve ainda a morte de 1,5 milhão de pessoas, sendo que 1,1 milhão eram HIV-negativo e 0,4 milhão eram pessoas com HIV-positivo. O número de mortes por TB é inaceitavelmente alto, quando com o diagnóstico rápido e o tratamento correto quase todas as pessoas com TB podem ser curadas (WHO, 2015).

Foram diagnosticados e registrados, em 2015, 63.189 casos novos de tuberculose no Brasil. O coeficiente de incidência de tuberculose passou de 38,7/100 mil habitantes em 2006 para 30,9/100 mil habitantes em 2015, o que corresponde a uma redução de 20,2%. Em 2014, foram diagnosticados 90.000 novos casos, perfazendo um coeficiente de incidência de 44/100.000 habitantes, além de uma mortalidade de 5.3 mil e uma prevalência de 110.000 habitantes (WHO, 2015).

Em 2013, foram diagnosticados no Brasil 71.123 casos novos de tuberculose, perfazendo um coeficiente de incidência de 35,4/100.000 habitantes. Em 2012, o sexo masculino apresentou uma taxa de incidência de 50,2/100.000 habitantes (2,1 vezes maior que o do sexo feminino). Observa-se também que, entre os homens, a faixa etária mais acometida é a de 40 a 59 anos e para as mulheres é a de 20 a 39 anos (WHO, 2015).

Quando analisadas as regiões do Brasil para o ano de 2015, nas capitais brasileiras, foram notificados 23.161 casos novos de tuberculose, o que corresponde a 36,6% do total do país. As capitais Manaus-AM (98,3/100 mil habitantes), Porto Alegre-RS (88,8/100 mil habitantes), Recife-PE (78,3/100 mil habitantes) e Rio de Janeiro-RJ (66,8/100 mil habitantes) destacaram-se por apresentarem coeficientes de incidência que excederam o valor nacional (30,9/100 mil habitantes) em mais de 100% (Ministério da Saúde, 2016).

A persistência do quadro epidemiológico da doença está relacionada a fatores como o empobrecimento de grande parte da população mundial, o advento da endemia do vírus HIV, o aumento na taxa de abandono do tratamento para TB e o aparecimento da resistência a múltiplos medicamentos antituberculose (WHO, 2015). Esta situação levou a OMS a detalhar um conjunto de intervenções que deveriam ser implantadas para alcançar metas de redução da doença até o ano de 2015 como, por exemplo, o desenvolvimento de novas drogas anti TB, de uma nova vacina e de testes diagnósticos rápidos e baratos para serem utilizados em postos de saúde (WHO, 2006a).

Na última década, o foco tem sido sobre o *Millennium Development Goals* (MDGs) onde, a taxa de incidência deveria estar caindo e a taxa de prevalência e a de mortalidade deveriam ser reduzidas pela metade em comparação com as taxas de 1990 e o *Stop TB Strategy* desenvolvido para o período de 2006-2015 era a abordagem recomendada pela OMS. Porém, com o final de 2015, o plano *Stop TB Strategy* e o *Millennium Development Goals* terminam e começa um quadro de desenvolvimento, o pós-2015 (2016-2030) (WHO, 2015).

Em 2014, foi aprovada na Assembleia Mundial de Saúde o *Global TB Strategy* e o *Sustainable Development Goals* com intuito de: i) reduzir o coeficiente de incidência para menos de 10 casos por 100 mil habitantes; e ii) reduzir o número de óbitos por tuberculose em 95%. A estratégia previa o estabelecimento de três pilares: prevenção e cuidado integrado e centrado no paciente; políticas arrojadas e sistemas de apoio; e intensificação da pesquisa e inovação (WHO, 2015).

c) Prevenção e tratamento da tuberculose

A vacina contra a tuberculose (BCG - Bacilo Calmette-Guérin) previne as formas graves de TB na criança, por exemplo, a TB meníngea, a forma pulmonar progressiva e a doença miliar. Admite-se que a BCG possa ter o mesmo efeito na prevenção de outras formas graves de TB em crianças, mas é menos eficaz na prevenção da TB pulmonar nos adultos, que é a forma de TB mais frequente. Novas vacinas são urgentemente necessárias, e a OMS e os membros da Parceria *Stop TB* estão trabalhando no desenvolvimento de alternativas à BCG (WHO, 2006).

A transmissibilidade está presente desde os primeiros sintomas respiratórios, caindo rapidamente após o início de tratamento efetivo. Durante muitos anos considerou-se que, após 15 dias de tratamento o paciente já não transmitia a doença. No entanto, com base em evidências de transmissão da tuberculose resistente a drogas, recomenda-se que seja também considerada a negatificação da baciloscopia (Behr *et al.*, 1999; Ministério da Saúde, 2011).

Levando-se em consideração o metabolismo e a localização do bacilo, o esquema terapêutico antituberculose deve atender a três grandes objetivos: a) ter atividade bactericida precoce (capacidade de matar o maior número de bacilos, o mais rapidamente possível, diminuindo a infectividade); b) ser capaz de prevenir o surgimento de cepas resistentes (utilização de esquemas terapêuticos com diferentes fármacos simultaneamente); e c) ter atividade esterilizante (capacidade de eliminar virtualmente todos os bacilos de uma lesão) (Ministério da Saúde, 2011).

Os fármacos antituberculose de primeira linha associados possuem as propriedades relacionadas anteriormente para o sucesso de um bom esquema terapêutico. A isoniazida e rifampicina são os medicamentos que juntos apresentam maior poder bactericida, sendo ativos em todas as populações sensíveis, quer intracavitária, nos granulomas, ou intracelulares. A rifampicina é o medicamento com maior poder esterilizante. Já a pirazinamida e a estreptomocina também são bactericidas contra algumas populações de bacilos. A pirazinamida é ativa apenas em meio ácido (intracelular ou no interior dos granulomas), enquanto que a estreptomocina é bactericida contra os bacilos de multiplicação rápida (localizados no interior das cavidades pulmonares). O etambutol, por sua vez, é bacteriostático e utilizado em associação com medicamentos mais potentes para prevenir o surgimento de cepas resistentes (Ministério da Saúde, 2011).

Como cada população micobacteriana tem diferentes proporções de bacilos com resistência natural aos diferentes medicamentos anti TB, a forma de evitar a seleção de bacilos resistentes é a utilização de esquemas terapêuticos com diferentes fármacos anti TB simultaneamente, uma vez que bacilos naturalmente resistentes a um medicamento podem ser sensíveis a outro. A rifampicina possui uma frequência de 1 mutante resistente a cada 10^7 - 10^8 bacilos, a etionamida possui uma frequência de 1 mutante a cada 10^3 - 10^6 bacilos, a pirazinamida possui uma frequência de 1 mutante a cada 10^2 - 10^4 bacilos, enquanto que a isoniazida, o etambutol e a estreptomocina apresentam frequência de 1 mutante a cada 10^5 - 10^6 bacilos (Gillespie SH, 2002; Ministério da Saúde, 2011).

O grande problema da TB é que, com exceção dos fármacos quinolônicos que não são específicos para tratar a doença, há mais de 30 anos não surge um novo fármaco potente para combatê-la, enquanto a resistência a múltiplos fármacos avança no mundo. O tratamento para tuberculose utiliza combinações de fármacos que foram desenvolvidas entre os anos de 1940 e 1950 e podem reduzir drasticamente as taxas de mortalidade. No Brasil, o II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos anti TB, realizado no período 2007-2008, mostrou em relação ao primeiro Inquérito (1997), um aumento da taxa de resistência primária à isoniazida (INH) de 3,5% para 6% e, para a rifampicina (RIF), de 0,2% para 1,5%. Estes fatos levaram o Programa Nacional de Controle da Tuberculose a acrescentar o etambutol (EMB) ao esquema inicial (rifampicina, isoniazida e pirazinamida), com o objetivo de eliminar o risco de falência e de recidiva nos pacientes com resistência primária isolada à INH ou à RIF. O esquema RIPE (Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol) já é usado, praticamente, em todos os países, há vários anos, com a mesma finalidade (Koul *et al.*, 2011, Braga & Trajman, 2015, Siqueira, 2010).

Essa recomendação e a apresentação farmacológica são as preconizadas pela OMS e são utilizadas na maioria dos países, para adultos e adolescentes. Em todos os esquemas a medicação é de uso diário e deve ser administrada em dose única. Diversas atividades foram desenvolvidas ao longo dos últimos anos: novas tecnologias foram incorporadas ao Sistema Único de Saúde (SUS), como um quarto fármaco (etambutol) no esquema básico de tratamento, a oferta dos medicamentos em doses fixas combinadas e mais, recentemente, o teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB) (Ministério da Saúde, 2011, Koul *et al.*, 2011, Braga & Trajman, 2015).

O teste Xpert MTB/Rif ou TRM-TB é um teste de amplificação do ácido nucléico totalmente automatizado baseado na detecção de TB e de resistência à rifampicina. Este teste utiliza um cartucho que contém todos os elementos necessários para a extração do ácido dextrorribonucleico (DNA), amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) e identificação de sequências de ácidos nucléicos alvo no genoma de TB e que, ao final, fornece os resultados em menos de 2 horas. Apesar de métodos moleculares já serem tecnologias comprovadas no diagnóstico da TB, os métodos existentes são complexos para o uso na rotina de países em desenvolvimento (WHO, 2016).

d) Tuberculose e a Resistência aos fármacos

Em microbiologia médica, o mecanismo mais frequente de resistência é a presença de plasmídeos de genes que controlam a síntese de enzimas modificadoras dos antibióticos que os tornam inativos na sua ação antibacteriana. No caso do *M. tuberculosis*, não há indicação de uma transferência horizontal de genes, isto é, aquisição de resistência por plasmídeos ou transposons (Smith *et al.*, 2013).

A resistência a antibióticos em *M. tuberculosis* é denominada de “resistência natural” e caracteriza-se por ocorrer em uma população bacteriana que nunca entrou em contato com medicamentos para TB. Em cada grupo de 10^7 a 10^9 bacilos, existe um que apresenta resistência natural à INH, outro à RMP, outros ainda ao etambutol. Esta é a razão porque não se pode tratar a TB com um só medicamento, porque o mesmo destrói uma grande quantidade de bacilos sensíveis, e os naturalmente resistentes ao fármaco passam a proliferar, surgindo uma nova cepa resistente ao mesmo. Este fato ocorreu com o uso inicial da estreptomicina (SM), no início da década de 1940, quando inicialmente a medicação foi eficaz, mas a seguir a TB ressurgiu resistente à SM em vários pacientes (Brasil, 2011).

Em relação ao mecanismo de resistência, este pode ser classificado em: a) resistência primária, quando um paciente nunca tratado para TB se contamina por bacilos previamente resistentes; e b) resistência adquirida ou secundária, que surge em pacientes com bacilos inicialmente sensíveis a um medicamento, mas que se tornam resistentes por exposição ao fármaco em doses abaixo da concentração mínima. As principais causas do surgimento da resistência adquirida são: doses inadequadas dos medicamentos, uso irregular do esquema terapêutico por má adesão, falta temporária de medicamento ou abandono do tratamento (Brasil, 2011).

De acordo com o padrão de resistência do bacilo, identificado pelo teste de sensibilidade, classificamos as resistências em monorresistência, quando a cepa apresenta resistência a apenas um fármaco antiTB, e polirresistência, quando a cepa apresenta resistência a dois ou mais fármacos, exceto a associação rifampicina e isoniazida. Caso ocorra a resistência simultânea à rifampicina e isoniazida, a cepa será considerada “Multidroga Resistente” (TB-MDR), e caso ocorra resistência à rifampicina e à isoniazida acrescida à resistência a uma fluoroquinolona e a um medicamento injetável de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina), será caracterizado então uma “Resistência extensiva” (TB-XDR – do inglês, *extensively drug resistant* – TB) (WHO, 2014).

Em 2013, foram notificados e acompanhados no Sistema de Informação de Tratamentos Especiais de Tuberculose (SITETB) 148 casos novos de monoresistência, 50 de polirresistência, 525 de TB-MDR, 21 de TB-XDR, 211 de micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT), além de 878 casos com indicação de uso de esquemas especiais em decorrência de hepatopatias, intolerância grave, alergia medicamentosa, comorbidades, falência ao esquema básico, entre outros (Ministério da Saúde, 2014).

A TB-MDR é significativamente mais difícil de tratar do que a TB sensível, em grande parte devido à necessidade de utilização de fármacos de segunda linha, mais caros, menos efetivos e associados ao maior número de efeitos colaterais (WHO, 2014).

Em resposta ao aumento crescente dos casos de TB-XDR, a OMS, em parceria com a *Global XDR-TB Task Force*, em outubro de 2006, organizaram um plano para o controle da TB-MDR e da TB-XDR. Entre várias medidas, este plano preconizava a avaliação e a implementação, em grande escala, de métodos rápidos para triagem de pacientes sob o risco de adquirir TB resistente (WHO, 2006). Mas, por motivos econômicos, em vários casos ainda se utiliza o meio de Löwenstein-Jensen para cultivo e teste de sensibilidade, que é mais demorado (28 a 42 dias), aumentando a possibilidade de transmissão de cepas resistentes (WHO, 2006; WHO, 2008).

e) Tuberculose extensivamente resistente aos fármacos (TB-XDR)

A TB-XDR é tratável e potencialmente curável. Alguns países com bons programas de controle da TB mostram que a cura é possível para mais de 50-60% de pessoas infectadas. O sucesso também depende do grau de resistência aos medicamentos, da gravidade da doença, do comprometimento ou não do sistema imunológico do doente e da rapidez no reconhecimento deste tipo de TB (WHO, 2006). Esquemas com medicamentos alternativos, por meio da administração de fármacos ainda não usados pelo paciente, com o uso de linezolida, capreomicina, clofazimida, PAS (Ácido para-aminossalicílico), etionamida, entre outros, para o tratamento da TB-XDR, podem ser montados. A ausência de resposta caracteriza a TB resistente, o paciente permanece bacilífero e transmissor deste tipo de resistência, até o óbito (WHO, 2014).

- Transmissão da TB-XDR

As pessoas doentes com tuberculose pulmonar, que são bacilíferas, podem propagar a doença tossindo, espirrando ou simplesmente falando, uma vez que expõem pequenas partículas com os bacilos para a atmosfera envolvente. Basta qualquer pessoa respirar um pequeno número dessas partículas para poder ficar infectada (tuberculose latente). Contudo, só umas poucas proporções destas pessoas vêm a contrair a tuberculose ativa. Em alguns casos, os bacilos infectantes já são resistentes, é o que acontece se provierem de uma pessoa que tenha tuberculose resistente. Outra maneira de adquirir TB-MDR ou TB-XDR é quando o doente com tuberculose desenvolve a sua própria resistência. Isto pode acontecer quando as drogas antituberculose são mal prescritas ou os esquemas de uso não são cumpridos. Também pode ser resultado de programas de controle da tuberculose deficientes em que, por exemplo, os pacientes com tuberculose não são acompanhados corretamente de forma a garantir o cumprimento correto e integral do seu tratamento; quando os médicos prescrevem tratamentos errados ou em dosagens erradas ou por um período curto de tempo; ou quando o fornecimento das drogas é irregular, podendo haver falha no abastecimento dos postos, ou ainda quando os medicamentos disponíveis são de má qualidade (WHO, 2006).

A transmissão do bacilo da TB depende de vários fatores, tais como o número de pessoas bacilíferas em um determinado local e da existência de pessoas com um alto risco de contraírem a infecção, tais como os infectados pelo vírus HIV. O risco de contágio é

diretamente proporcional ao tempo em que uma pessoa não infectada permanece no mesmo espaço com outra pessoa bacilífera (WHO, 2006). O risco de transmissão aumenta onde houver uma alta concentração de bacilos da TB, como geralmente acontece em ambientes fechados, salas demasiadamente cheias de gente, hospitais ou prisões. O risco de transmissão é ainda maior se a ventilação do local for deficiente. A chance de ocorrer transmissão do bacilo é reduzida se as pessoas com TB forem tratadas corretamente (WHO, 2006).

Os profissionais de saúde que tratam os pacientes com TB devem estar cientes da possibilidade de resistência às drogas, e devem ter acesso aos laboratórios que fornecem diagnósticos rápidos e credíveis, a fim de ter, tão rapidamente o quanto possível, o tratamento adequado. O tratamento da XDR-TB para ser efetivo, requer profissionais de saúde formados e a garantia de acesso às drogas de segunda linha (WHO, 2006).

f) Detecção de Resistência

O conhecimento das taxas de resistência permite avaliar a qualidade dos programas de controle da tuberculose de um país e possibilita a modificação de esquemas terapêuticos vigentes. A realização de testes de sensibilidade é indicada em casos de pacientes com suspeita de resistência, por abandono, por falência de tratamento, por recidiva ou por ser contato de um caso de tuberculose resistente (Brasil, 2008). A sensibilidade do *M. tuberculosis* aos fármacos pode ser avaliada por métodos fenotípicos e moleculares.

- Métodos fenotípicos no diagnóstico da resistência do MTB

A sensibilidade do *M. tuberculosis* a drogas pode ser avaliada por três métodos: método das concentrações absolutas, método da razão de resistência e o método das proporções. Esses são considerados os métodos clássicos ou convencionais para o teste de sensibilidade (TS) de *M. tuberculosis* (Canetti *et al.*, 1963).

O método das proporções é um método fenotípico que foi descrito por Canetti, Rist e Grosset em 1963 (teste padrão) e em 1969 (teste simplificado). Este método é realizado em meio de cultura Löwenstein-Jensen (LJ), onde as drogas são incorporadas antes da coagulação do meio. A versão simplificada do teste, com apenas uma concentração da droga, é a mais utilizada. Consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes contidos em uma amostra de *M. tuberculosis*, frente a uma concentração da droga, que é capaz de inibir o desenvolvimento

das células sensíveis, mas não o das células resistentes – “concentração crítica” (Canetti *et al.*, 1963).

As drogas utilizadas no TS são as do esquema de tratamento de primeira linha (SM, INH, RMP e EMB). No entanto, para poder interpretar o resultado do TS é necessário que aconteçam duas condições simultaneamente:

- Crescimento suficiente (mais de 100 colônias) no tubo controle (LJ sem droga) semeado com a diluição mais concentrada (10^{-3}), para que seja possível detectar mutantes resistentes que estejam em menor porcentagem (cerca de 1%) entre os bacilos inoculados;
- Colônias separadas e contáveis no tubo controle (LJ sem droga) semeado com a diluição menos concentrada (10^{-5}). Essa condição é indispensável quando aparecem colônias resistentes cuja proporção deve ser determinada (cálculo da porcentagem).

A primeira leitura é feita com 28 dias de incubação para ver se houve desenvolvimento de colônias suficiente para interpretar os resultados. Se houve casos de resistência com contagem de colônias suficiente para interpretar o resultado, este pode ser emitido nesse período. Se não houve resistência (todas as drogas estão sensíveis), aguarda-se a segunda leitura ao final de 42 dias. Essa precaução é para assegurar o aparecimento tardio de colônias mutantes resistentes (Brasil, 2008).

Outro tipo de método fenotípico é o BACTEC MGIT 960, que é um sistema automatizado para detecção de crescimento de micobactérias e TS a drogas para o *M. tuberculosis*. O MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*) consiste em meio líquido, o qual as micobactérias crescem mais rapidamente (Siddiqi & Rüsç-Gerdes, 2006).

O teste realizado pelo sistema BACTEC MGIT 960 baseia-se no princípio da relação entre o consumo de oxigênio e a quantidade de bactérias. Brevemente, o tubo de MGIT contém um anel de silicone contendo um sensor fluorescente cuja emissão é inibida em presença de oxigênio. Ao adicionar micobactérias ao tubo, o crescimento bacteriano acarretará no consumo de oxigênio, o que resultará na emissão proporcional de fluorescência, que será detectada pelo detector do aparelho a cada 60 minutos (Siddiqi & Rüsç-Gerdes, 2006). O equipamento interpreta o resultado do teste de sensibilidade quando a unidade de crescimento (GU; *Growth Unit*) no tubo controle atinge o valor de 400 (geralmente entre 4 e 13 dias). O aparelho então interpreta os resultados dos tubos com antibióticos em sensíveis (quando o valor da GU do tubo for inferior a 100) e resistentes (quando o valor da GU do tubo for igual ou superior a 100). Os preços do aparelho e dos reagentes são excessivamente altos para a maioria dos estabelecimentos públicos o que impede seu uso de forma sistemática (Siddiqi & Rüsç-Gerdes, 2006).

- Métodos moleculares no diagnóstico de resistência do MTB

Os mecanismos genômicos associados à multirresistência do *M. tuberculosis* geralmente envolvem mutações nos genes que codificam determinadas proteínas, que são inibidas pelos fármacos. As mutações podem produzir trocas de aminoácidos, que geram uma proteína com menos atividade ou menos afinidade pelo fármaco, ou modifica a ação dos promotores dos genes, alterando a sua expressão gênica. Alguns dos genes envolvidos na resistência a determinados fármacos no tratamento anti-TB podem ser observado no quadro 1. (Smith *et al.*, 2013)

Quadro 1 - Genes envolvidos na resistência a fármacos antituberculose

Antibióticos	rpoB	katG	inhA	embB	pncA	rrs	eis	tlyA	gyrA
RIFAMPICINA	■								
ISONIAZIDA		■	■						
ETAMBUTOL				■					
PIRAZINAMIDA					■				
AMICACINA						■			
KANAMICINA						■	■		
CAPREOMICINA						■		■	
CIPROFLOXACINA									■
OFLOXACINA									■

Legenda: Quadro relacionando os principais genes envolvidos na resistência aos antibióticos.

Um dos métodos moleculares de detecção de resistência é o sequenciamento dos genes que se realiza com a reação de PCR, numa fase anterior, que delimita e amplifica a região a ser analisada. A região delimitada produz uma sequência de nucleotídeos, que é alinhada com a sequência de referência para *M. tuberculosis*, para a determinação das mutações e consequentemente, da resistência específica a um fármaco (Freitas, Siqueira, Albano, 2009).

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 e para o diagnóstico de mutações de forma mais rápida e simples (Freitas, Siqueira, Albano, 2009).

Um método rápido para diagnóstico de mutações é o *GenoType*® MTBDRsl (Hain Lifescience, Alemanha) que consiste na detecção de mutações específicas notoriamente associadas com a resistência aos fármacos de segunda linha. Este método depende de instalações apropriadas e de kits que são de alto custo para uso em instituições públicas.

O método MAS-PCR é rápido e simples para diagnóstico de resistência do MTB. Foi inicialmente descrito para identificação de mutações no genoma humano que causavam fibrose cística, e inicialmente descrito por Mokrousov (2008), foi adaptado para o diagnóstico de resistência do MTB ao etambutol, isoniazida e rifampicina. A técnica consiste na realização de várias reações de PCR em um só tubo, usando um oligonucleotídeo reverso longo e diversos oligonucleotídeos diretos pequenos e específicos para o diagnóstico de mutações nos códons de interesse. Uma característica importante do método é a necessidade de existir em algumas regiões do DNA em que incidam grande quantidade de mutações, denominadas de “regiões *hotspot*”. O método é rápido e pode ser implantado em laboratório comum de biologia molecular, sem gastos excessivos. Joanna Evans e Heidi Segal em 2010 utilizaram o método para o diagnóstico de resistência as FLQs e KAN (Broude *et al.*, 2002).

As fluoroquinolonas são potentes drogas de segunda linha recomendadas para o tratamento de MDR-TB. O principal alvo da fluoroquinolona é a DNA girase, uma topoisomerase do tipo II composta por duas subunidades, A e B, codificada, respectivamente, pelos genes *gyrA* e *gyrB*. As mutações nas regiões desses genes são os os mecanismos primários para desenvolver resistências as fluoroquinolonas (Mokrousov, 2008). Em 2012, Vadwai e colaboradores mostraram que isolados resistentes as fluoroquinolonas possuíam 73% e 20% de mutações nos códons 94 e 90 do gene *gyrA*, respectivamente (colocar referência).

O uso de “fármacos de segunda linha” injetáveis, amicacina (AMK), canamicina (KAN) e capreomicina (CAP) é essencial para um tratamento eficaz de TB-MDR e para a prevenção da TB-XDR. Os diagnósticos convencionais para resistência aos fármacos em cepas MTB são dependentes de culturas e testes de susceptibilidade em meios líquidos ou sólidos. Enquanto esses métodos são eficazes para a detecção de resistência à isoniazida e rifampicina, a detecção de resistência à amicacina, canamicina e capreomicina é mais complicado e menos confiável (Geroghiou, 2012).

Os genes associados à resistência as fármacos injetáveis de segunda linha foram identificados com base no entendimento do mecanismo de ação dos aminoglicosídeos (AMK,

KAN) e ciclopeptídeos (CAP) em MTB. Tanto a AMK quanto a KAN se ligam ao 16S rRNA na subunidade 30S e inibem a síntese protéica. O mecanismo de ação da CAP em MTB não é muito compreendido, mas parece interferir com a etapa de tradução e a inibição da síntese da fenilalanina. As mutações gênicas mais bem estudadas e que se acredita produzir resistência a estes medicamentos injetáveis de segunda linha ocorrem nos genes *rrs* e *tlyA*. Entretanto, as mutações mais comumente publicadas ocorrem nos códons 1401 e 1484 do gene *rrs*, mostrando uma porcentagem de 75% e 20%, respectivamente (Vadwai, 2012; Geroghiou, 2012).

1 JUSTIFICATIVA

Em função do cenário atual da tuberculose no mundo, dos crescentes números de casos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* cada vez mais resistentes aos antibióticos utilizados no tratamento, e em função da demora inerente aos métodos de diagnóstico em avaliar a resistência nas amostras clínicas, este trabalho foi desenhado com intuito de se avaliar um método molecular (MAS-PCR) que pudesse ser inserido na rotina de diagnóstico e que fornecesse resultados precisos e com rapidez.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o método molecular MAS-PCR na detecção de mutações nos genes associados à resistência as fluoroquinolonas, amicacina e canamicina, em cepas de *M. tuberculosis*, diagnosticadas como resistentes e multirresistentes, armazenadas no Laboratório de Bacteriologia da Tuberculose – CRPHF/ENSP/FIOCRUZ.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a sensibilidade e a especificidade do método MAS-PCR quando comparado aos resultados obtidos pelo método fenotípico MGIT 960;
- b) Confirmar os resultados obtidos pelas técnicas MAS-PCR e MGIT pela análise de sequenciamento;
- c) Determinar a frequência de mutações nos genes *gyrA* e *rrs* em cepas de *M. tuberculosis* resistentes as fluoroquinolonas e à amicacina, canamicina e/ou capreomicina (fármacos injetáveis de segunda linha).

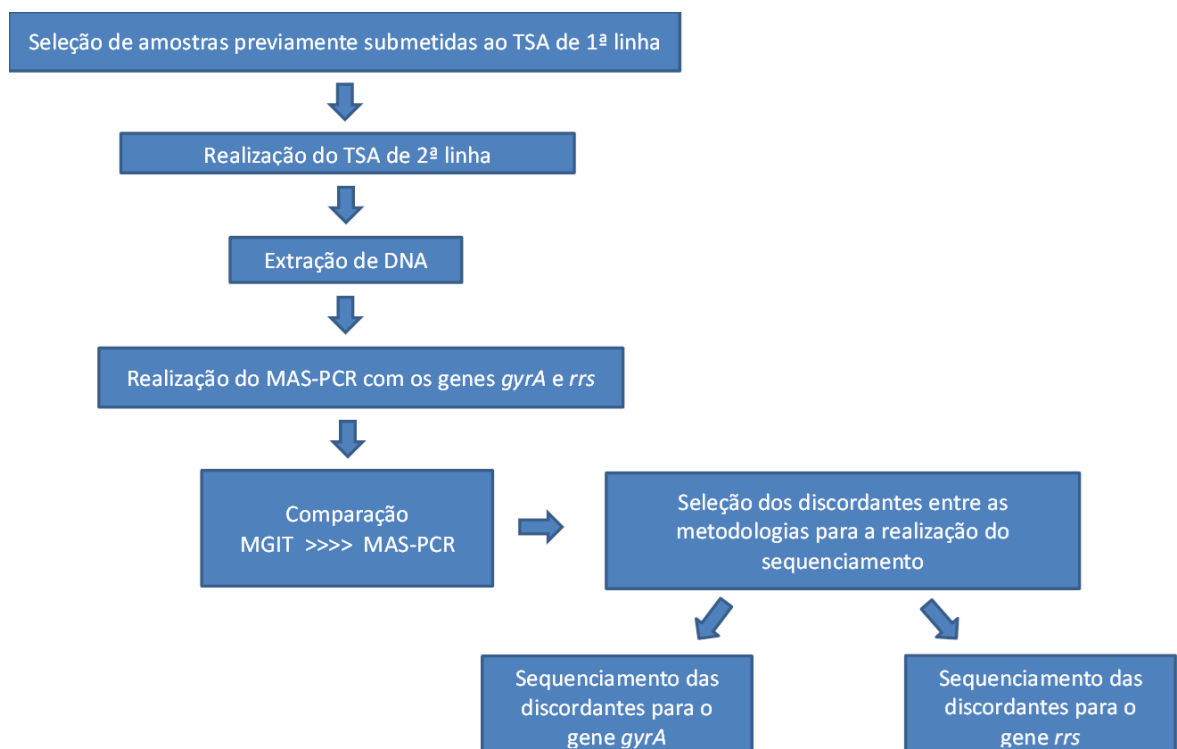
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fluxograma

Foram selecionadas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que haviam sido previamente submetidas ao teste de sensibilidade pelo método fenotípico MGIT 960 para 1ª linha. Caso fosse MDR (resistente simultaneamente à rifampicina e à isoniazida), também era realizado o teste de sensibilidade para os fármacos de segunda linha. Após a realização do teste de sensibilidade, o DNA das cepas foi extraído para a realização do MAS-PCR para os genes *gyrA* e *rrs*.

Após a comparação entre o resultados dos métodos (teste de sensibilidade e MAS-PCR), as cepas que apresentaram resultados discordantes tiveram seu DNA submetido ao sequenciamento para cada um dos genes (*gyrA* e *rrs*).

Figura 2 - Fluxograma do estudo



Legenda: TSA – Teste de sensibilidade; MGIT - *Mycobacteria Growth Indicator Tube*; MAS-PCR - *Multiplex allele-specific* – PCR

3.2 Amostras do estudo

Cem cepas de *M. tuberculosis* foram previamente submetidas ao teste de sensibilidade aos fármacos de primeira linha (estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol), fazendo parte do acervo de cepas do Laboratório de Bacteriologia da Tuberculose do CRPHF/ENSP/FIOCRUZ, onde estavam armazenadas em freezer a -70°C.

3.3 Teste de sensibilidade pelo sistema BACTEC MGIT 960

As cepas de *M. tuberculosis* selecionadas foram semeadas em meio LJ durante 20 dias para a posterior realização do teste de sensibilidade para os fármacos de segunda linha (ofloxacina (OFLO), amicacina, canamicina e capreomicina) pelo Sistema BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickson & Company, New Jersey, USA).

A partir do crescimento em meio LJ foi emulsionada uma alça bacteriológica descartável estéril na massa bacteriana e feita uma suspensão homogênea de bactérias em um tubo com pérolas de vidro. Em seguida, a suspensão foi deixada em repouso por 15 minutos, para decantar as partículas maiores e para evitar dispersão de aerossóis. Foi retirado cerca de 1 mL do sobrenadante e gotejado no tubo da escala, ajustando a turvação da suspensão com o tubo nº 1 McFarland. Diluímos 1 mL da suspensão acima em 4 mL de água destilada estéril (suspensão 1:5) e 0,1 mL da suspensão em 10 mL de água destilada estéril (suspensão 1:100). Feito isso, foi inoculado no tubo MGIT o controle de crescimento, 0,5 mL da suspensão 1:100 e nos tubos contendo os fármacos, foi inoculado 0,5 mL da suspensão 1:5 em cada um dos tubos contendo amicacina, ofloxacina, canamicina, capreomicina. Ao final todos os tubos foram incubados no sistema BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickson & Company)

3.4 *Multiplex allele-specific* – PCR (MAS-PCR)

3.4.1 Isolamento do DNA

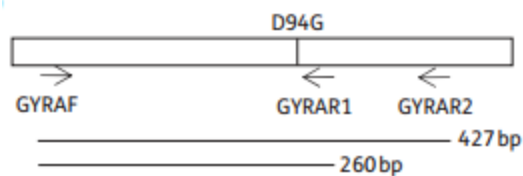
A partir do cultivo em meio solidificado foi emulsionada uma alça de crescimento, e transferimos para um microtubo com capacidade para 2 mL contendo 100 µL de *Glass Beads*. A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e, em seguida, adicionado 300 µL de TE (Tris-EDTA)-Triton X100 1% (pH 8,0), e novamente agitada em vórtex por 1 minuto. Após a agitação, os microtubos foram colocados em repouso à temperatura ambiente por 8 min.

Transferimos 100 μL do tampão de lise (partes iguais de TE-Triton a 1%, Chelex a 100 15% e Tween 20 a 0,5%) para um microtubo com capacidade de 0,5 mL, e adicionamos 50 μL da mistura obtida na fase A da extração. Depois, o microtubo foi agitado por 1 min e os aquecemos em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Quebec, Canada) por 20 min a 100°C. Em seguida, agitamos por 2 min e centrifugamos a 13.000 rpm por 8 min para obter duas camadas distintas. O sobrenadante foi utilizado na técnica de PCR.

3.4.2 Amplificação parcial por PCR dos genes *gyrA* e *rrs*

gyrA: O *mix* da PCR foi preparado com, 5 μL tampão da enzima 10x (- MgCl_2), 1,5 μL MgCl_2 (50 mM), 1 μL de iniciadores (20 pmoles/ μL), *gyrAF* (5' GTG AGA TGT TGG GTT AAG TCC 3'), *gyrAR1* (94) (5' CCA TGC GCA CCA GGC TGT 3') e *gyrAR2* (5' GTT AGG GAT GAA ATC GAC TG 3') (Figura 3), 0,4 μL de dNTPs (25 mM), 0,2 μL da enzima Taq Polimerase (5 U/ μL – Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 2 μL de DNA e água destilada q.s.p. (quantidade suficiente para), para um volume total de 50 μL . As reações de amplificação ocorreram em um termociclador MJ96+/MJ96G (Biocycler, Ramsey, MN, USA) começando com uma desnaturação a 95°C por 2 min, seguido por 20 ciclos de amplificação (de 1 min a 94°C, 1 min a 72° C e 1 min a 72°C), 30 ciclos (de 1 min a 94°C, 1 min a 60° C e 1 min a 72°C) e um ciclo de extensão (10 min a 72°C).

Figura 3 - Desenho dos primers do gene *gyrA*

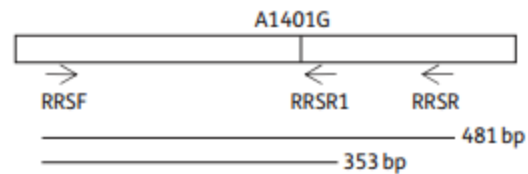


Legenda: Desenho dos *primers forward* e *reverse* utilizados no PCR para o gene *gyrA*.
Fonte: Evans & Segal, 2010.

rrs: O *mix* da PCR foi preparado com 5 μL tampão da enzima 10x (MgCl_2), 1,5 μL MgCl_2 (50 mM), 1 μL de iniciadores (20 pmoles/ μL), *rrsF* (5' GTG AGA TGT TGG GTT AAG TCC 3'), *rrsR1* (1401) (5' GTT ACC GAC TTT CAT GAC GT 3') e *rrsR2* (5' TGG TGC TCC TTA GAA AGG AG 3') (Figura 4), 0,4 μL de dNTPs (25 mM), 0,2 μL da enzima

Taq Polimerase (5 U/ μ L – Invitrogen), 2 μ L de DNA e água destilada q.s.p., completando um volume total de 50 μ L. As reações de amplificação ocorreram em um termociclador MJ96+/MJ96G (Biocycler), começando com uma desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 20 ciclos de amplificação (de 1 min a 94°C, 1 min a 72° C e 1 min a 72°C), 30 ciclos (de 1 min a 94°C, 1 min a 62° C e 1 min a 72°C) e um ciclo de extensão (10 min a 72°C).

Figura 4 - Desenho dos primers do gene *rrs*.



Legenda: : Desenho dos primers forward e reverse utilizados no PCR para o gener *rrs*.

Fonte: Evans&Segal, 2010

3.4.3 Corrida eletroforética

A separação eletroforética dos fragmentos amplificados foi realizada em géis de agarose a 2%, em tampão TBE (Tampão Borato EDTA) 1X, em cubas LOCCUS Biotecnologia LCH 13x15 cm ou LCH 7x8 cm. Em cada poço do gel foram adicionados e misturados os seguintes reagentes: 2 μ L de tampão ABF, 1 μ L do corante *Gel Red* (1:500) (Biotium, Hayward, CA, USA) e 5 μ L da amostra da PCR (cerca de 100 a 200 ng). Como controle, uma canaleta recebeu o marcador de peso molecular, 100bp DNA *Ladder* (Easy Path, São Paulo, Brazil), e a ordem das amostras foram anotadas. A separação eletrofóretica ocorreu a 86 a 90 volts por aproximadamente por 1 h. Depois disso, retirou-se o gel da cuba, que foi lavado em água corrente. Em seguida, cada gel foi transferido para um transiluminador MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) e observado sob luz UV. As imagens dos géis foram digitalizadas com dispositivo de gel captura MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems). A determinação do perfil em *wildtype* (WT) ou mutante foi realizada observando-se a presença de uma segunda banda ou não da amostra analisada.

3.5 Sequenciamento

3.5.1 Reação da PCR – Amplificação do genes *gyrA* e *rrs*

Foi utilizado o mesmo *mix* da PCR preparado no MAS-PCR. A separação eletroforética foi realizada como descrito anteriormente na técnica do MAS-PCR, e a determinação aproximada do tamanho dos fragmentos foi estimada comparando-se a corrida da amostra em questão com a corrida dos fragmentos do marcador de peso molecular.

3.5.2 Purificação dos produtos da PCR

A purificação dos seus produtos da PCR foi realizada com o ExoSAP-IT PCR Clean up Kit. Um volume de 2 μL de ExoSAP-IT foi adicionado em cada poço de uma microplaca com 96 poços e, em seguida, foram adicionados 5 μL de cada DNA alvo. A centrifugação foi realizada por 30 seg à 13.000 rpm e depois, a placa foi colocada em um termociclador MJ96+/MJ96G (Biocycler) por 15 min a 37°C, seguido de mais 15 min a 80°C para a inativação da enzima. Ao término, a placa foi centrifugada novamente por 30 seg e, em seguida, vedada com fita adesiva e envolta em papel alumínio para ser estocada no freezer a -20°C até a sua utilização.

3.5.3 Reações da PCR para o sequenciamento

Foram preparadas três reações separadas, uma para cada iniciador, contendo 1,5 μL de Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit versão 3.1 (Applied Biosystems, Waltham, MA USA), 1,0 μL do tampão de diluição 5X, água q.s.p., 4,0 μL do iniciador *gyrAF*, *gyrAR1*(94) e *gyrAR2* (0,8 pmoles/ μL) e 2,0 μL do produto da PCR purificado. Os três primeiros reagentes foram homogeneizados, formando uma mistura para cada iniciador, e essas colocadas em cada um dos poços da microplaca e adicionou-se 2,0 μL do produto da PCR purificado. Depois disso, a placa foi levada ao termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), onde ocorreu a reação de extensão.

3.5.4 Precipitação da reação de sequenciamento

Após a reação de extensão, os poços da placa passam a conter o DNA e iniciadores não incorporados. Por isso, faz-se necessário separar o DNA alvo desses outros compostos por precipitação.

A placa foi submetida à breve centrifugação até atingir 6.000 rpm. Trinta microlitros de isopropanol 75% são adicionados em cada poço e esta é levada ao vórtex por 10 seg. A placa é mantida em repouso por 15 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, foi centrifugada por 1 h à 2.800 rpm. Descartado o sobrenadante, adicionou-se 50 µL de etanol 75% em cada poço e, centrifugou-se por mais 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa foi centrifugada invertida sobre uma toalha de papel absorvente. A mesma foi deixada ao abrigo da luz no termociclador MJ96+/MJ96G (Biocycler) a 60°C por 10 min para a evaporação do álcool (a tampa do termociclador necessita ser mantida aberta durante esse período).

3.5.5 Desnaturação

Após o processo de precipitação, os produtos da reação da PCR de sequenciamento precisam ser preparados para a eletroforese no sequenciador, passando pela etapa de desnaturação, que consiste na separação da dupla fita de DNA, utilizando formamida, um composto altamente desnaturante. Para isto, foram adicionados 10 µL de formamida HI-DI (Applied Biosystems) em cada poço da placa. Após, esta foi submetida à breve centrifugação (que é interrompida quando se atinge aproximadamente 600 rpm). A placa foi colocada no termociclador MJ96+/MJ96G (Biocycler) à 95°C por 3 min. Após a desnaturação, a placa foi colocada em um recipiente com gelo por 10 min e novamente submetida à breve centrifugação. Então, a placa foi levada ao sequenciador modelo 3130 (Applied Biosystems) para a eletroforese.

3.5.6 Análise das sequências

As sequências obtidas foram editadas com o auxílio do programa ChromasPro versão 1.42 (TECHNELYSIUM, PTY Ltd), disponível na internet no endereço eletrônico (www.technelysium.com.au/ChromasPro.html). O resultado do sequenciamento foi comparado através do programa BLAST (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com a sequência da cepa de *M. tuberculosis* tipo H37Rv depositada no GenBank. Tal análise tem por objetivo analisar não só as mutações avaliadas pelo MAS-PCR, mas também outras mutações que poderiam contribuir para a resistência aos fármacos observada. A sequência de *gyrA* usada como referência para a avaliação de mutações compreende à região 7302 a 9818 do genoma da cepa tipo (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/887105>).

3.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados referentes aos cálculos de sensibilidade, de especificidade e de valores preditivos foram realizados no programa WIN EPISCOPE versão 2.0 (Thrusfield *et al.*, 2001).

4 CONSIDERAÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

Todas as etapas experimentais deste trabalho foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia da Tuberculose do CRPHF/ENSP/FIOCRUZ. Cada metodologia foi realizada em áreas de contenção biológica segundo o preconizado pelo Ministério da Saúde. Em detalhes, os procedimentos necessários para a realização dos testes de sensibilidade foram realizados em ambiente com Nível de Biossegurança 3, enquanto que a MAS-PCR e o sequenciamento foram realizados em Nível de Biossegurança 2 (Brasil, 2008).

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho não necessita de apreciação em comitês de ética uma vez que objetivo é o desenvolvimento de uma metodologia de diagnóstico rápido do perfil de resistência a antimicrobianos em amostras de *Mycobacterium tuberculosis*, utilizando para isto cepas de bactérias armazenadas no Laboratório de Referência Nacional de Tuberculose (CRPHF/ENSP/FIOCRUZ). Desta forma, por não utilizar seres humanos em nenhuma dimensão, este trabalho não apresenta os requisitos para apreciação em Comitê de Ética em Pesquisa (Conselho Nacional de Saúde; Resolução N° 466, de 12 de Dezembro de 2012). Além disso, por não envolver a utilização de vertebrados (apenas bactérias), este trabalho não é aplicável para apreciação junto a Comissão de Ética no Uso de Animais (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal; Orientação Técnica N° 3, de 22 de Outubro de 2013).

6 RESULTADOS

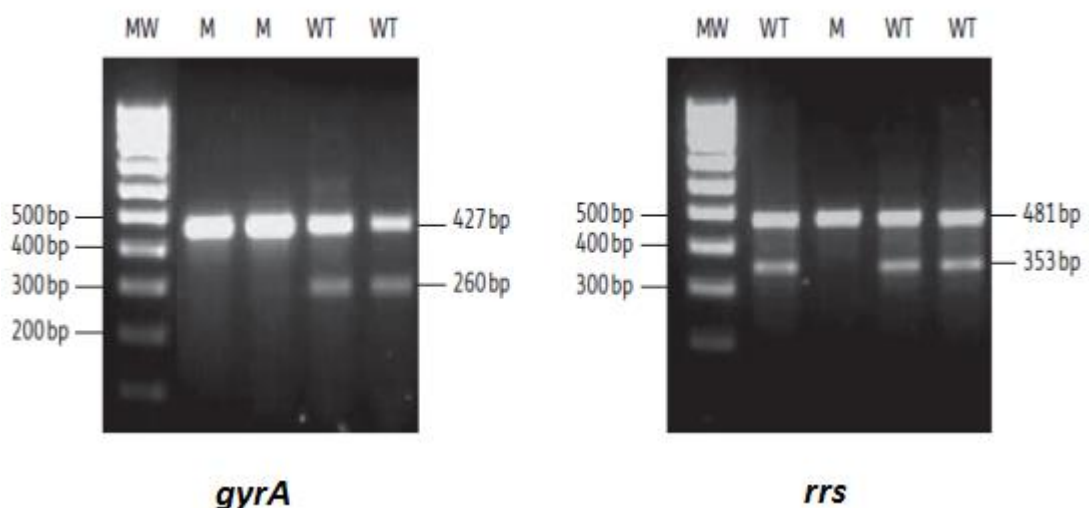
As 100 cepas de *M. tuberculosis* incluídas nesse estudo foram isoladas e foram avaliadas quanto a sua sensibilidade aos fármacos de segunda linha ofloxacina (fluoroquinolonas), amicacina, canamicina e capreomicina (fármacos injetáveis de segunda linha) pelo sistema BACTEC MGIT 960.

Como resultado desta análise observamos que 11% das amostras são sensíveis a todos os fármacos acima citados; 43% das amostras apresentam monoresistência à ofloxacina; 12% das amostras apresentaram resistência aos fármacos: amicacina, canamicina e capreomicina; 34% das amostras foram diagnosticadas como XDR.

Inicialmente, visando avaliar as condições das reações da PCR, foi realizada a amplificação de regiões dos genes de interesse (*gyrA* e *rrs*) a partir do genoma da cepa referência de *M. tuberculosis* tipo H37Ra. Os produtos da amplificação das reações de PCR apresentaram resultados satisfatórios.

Com os parâmetros da PCR definidos, realizamos a análise das amostras pelo método de MAS-PCR, avaliando mutações pontuais no gene *gyrA* na posição 94 (Figura 4), o qual está classicamente associado a resistência à fluoroquinolona e no gene *rrs* na posição 1401 (Figura 5), que está associado a resistência à amicacina e à canamicina.

Figura 5 - Corrida eletroforética do MAS-PCR de ambos os genes



Legenda: MW – Peso molecular/ WT (*Wild type*, selvagem) - Cepa selvagem (cepa com DNA idêntico à cepa padrão) / MUT- mutado (cepa com DNA com sequência nucleotídica diferente da cepa padrão).

A comparação dos resultados obtidos pelo método molecular MAS-PCR e pelo método fenotípico MGIT mostrou discordância de 42% para o gene *gyrA* e de 32% para o gene *rrs* entre os métodos, onde nem sempre amostras que são identificadas como “resistentes” no MGIT são também identificadas como “mutantes” no MAS-PCR.

As discordâncias em relação à resistência as fluoroquinolonas e mutação no gene *gyrA* na posição 94 foram avaliada pela análise por sequenciamento, uma vez que existe mutações no gene *gyrA* em regiões diferentes daquelas verificadas pelo método MAS-PCR (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise comparativa entre os métodos de MGIT, MAS-PCR e sequenciamento no gene *gyrA*

Amostra	Resistência detectada (MGIT)	Classificação	MAS-PCR	Sequenciamento	
			<i>gyrA</i> (94)	<i>gyrA</i> 94	Mutações
1	S, I, R / O	MDR	WT	WT	95
2	S, I, R, E / O	MDR	MUT	-	-
3	S, I, R, / A, O, K	XDR	WT	WT	90/95
4	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	WT	WT	90/95
5	I, R / O, K	XDR	WT	MUT	95
6	S, I, R, E / O	MDR	MUT	-	-
7	S, I, R / O	MDR	MUT	-	-
8	S, I, R / O	MDR	MUT	-	-
9	I, R, E / O	MDR	MUT	-	-
10	S, I, R / O	MDR	MUT	-	-
11	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	WT	WT	95
12	I, R	MDR	WT	-	-
13	S, I, R / O	MDR	MUT	-	-
14	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	95
15	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	95
16	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	89/95
17	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	95
18	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	WT	WT	95
19	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	WT	MUT	95
20	S, I, R, E / A	MDR	WT	-	-
21	S, I, R, E / A	MDR	MUT	WT	95
22	I, R / O	MDR	MUT	-	-
23	I, R / O	MDR	MUT	-	-
24	I, R / O	MDR	WT	WT	95
25	S, I, R, E / O	MDR	WT	WT	90/95
26	S, I, R, E / A, O, C	XDR	MUT	-	-
27	I, R / O	MDR	WT	WT	91/95
28	I, R, E / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
29	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
30	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	-

31	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	90/95
32	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
33	I, R / O	MDR	WT	WT	91
34	I, R / O	MDR	WT	WT	-
35	I, R / O	MDR	WT	WT	91/95
36	I, R / O	MDR	WT	MUT	95
37	I, R / O	MDR	WT	WT	-
38	I, R / O	MDR	WT	WT	95
39	I, R / A, K	MDR	WT	-	-
40	S, I, R / A, K	MDR	WT	-	-
41	I, R, E / O	MDR	MUT	-	-
42	S, I, R, E / O	MDR	WT	MUT	95
43	I, R / O	MDR	MUT	-	-
44	S, I, R, E / O	MDR	WT	MUT	95
45	S, I, R, E / O	MDR	WT	WT	-
46	I, R, E / O	MDR	MUT	-	-
47	S, I, R, E / O	MDR	WT	WT	95
48	I, R, E / O	MDR	MUT	-	-
49	R / O	Monorresistência	MUT	-	-
50	I, R, E / O	MDR	MUT	-	-
51	I, R / O	MDR	MUT	-	-
52	I, R / O	MDR	WT	WT	91/95
53	I, R / O	MDR	WT	WT	95
54	I, R / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
55	S, I, R, E	MDR	WT	-	-
56	I	Monorresistência	WT	-	-
57	I, R	MDR	WT	-	-
58	I, R / O, K	XDR	WT	WT	95
59	I, R / O	MDR	WT	WT	95
60	I, R, E / O	MDR	WT	WT	-
61	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	WT	WT	-
62	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	WT	WT	88/95
63	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
64	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	95
65	S, I, R / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
66	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	95
67	S, I, R / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
68	S, I, R / A, O, K	XDR	MUT	-	-
69	I, R / A, K, C	MDR	WT	-	-
70	I, R / A, K, C	MDR	WT	-	-
71	I, R / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
72	I, R / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
73	I, R / O, K	XDR	WT	MUT	95
74	I, R / C	MDR	WT	-	-
75	I, R / C	MDR	WT	-	-
76	I, R / A, O, K, C	XDR	WT	MUT	95
77	I, R / K	MDR	WT	-	-
78	I, R / O	MDR	MUT	-	-

79	I, R / O	MDR	WT	WT	95
80	I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	90/95
81	I, R / K, C	MDR	WT	-	-
82	I, R / O	MDR	MUT	-	-
83	I, R / O	MDR	WT	WT	95
84	I, R / A, K	MDR	WT	-	-
85	I, R / A, C	MDR	WT	-	-
86	Não possui resistência	Sensível	WT	-	-
87	Não possui resistência	Sensível	WT	-	-
88	Não possui resistência	Sensível	WT	-	-
89	Não possui resistência	Sensível	WT	-	-
90	Não possui resistência	Sensível	WT	-	-
91	Não possui resistência	Sensível	WT	-	-
92	Não possui resistência	Sensível	WT	-	-
93	I, R / O	MDR	WT	WT	91/95
94	S, I, R, E / O, K	XDR	MUT	-	-
95	S, I, R / O	MDR	MUT	-	-
96	S, I, R, E / O, A	XDR	MUT	-	-
97	S, I, R / O	MDR	MUT	-	-
98	I, R / O	MDR	MUT	-	-
99	S, I, R, E / O, C	XDR	MUT	-	-
100	S, I, R, E / O	MDR	MUT	-	-

Legenda: S- Estreptomicina/ I- Isoniazida/ R- Rifampicina/ E- Etambutol/ A- Amicacina/ O- Ofloxacina / K- Canamicina/ C- Capreomicina. WT (Wild type) - Cepa selvagem (cepa com DNA idêntico à cepa padrão) / MUT- mutado (cepa com DNA com sequência nucleotídica diferente da cepa padrão). MDR – Multidroga resistente/ XDR – Extensivamente resistente.

A comparação dos resultados obtidos pelo MAS-PCR no gene *gyrA* com a resistência microbiológica para ofloxacina observada no MGIT pode ser visualizada na tabela 2, onde observamos que o MAS-PCR para a mutação na posição 94 do gene *gyrA*, apresenta uma sensibilidade de 46,8% e uma especificidade de 95,7%. O valor baixo da sensibilidade se deve ao fato de que algumas amostras resistentes não apresentaram mutação na posição 94 quando avaliados pelo método MAS-PCR.

Tabela 2 - Análise comparativa dos resultados obtidos no MAS-PCR para o gene *gyrA* (posição 94) e a resistência observada no MGIT

	MGIT			
		Sensível	Resistente	Total
MAS-PCR	WT	22	41	63
	Mutado	1	36	37
Total		23	77	100

Legenda: Os resultados obtidos no MAS-PCR (*gyrA* na posição 94) foram comparados com a resistência a ofloxacina (fluroquinolona) observada no MGIT.

Os resultados discordantes foram elucidados por sequenciamento, onde foi possível observar a presença de mutações em outras regiões, por exemplo, nas regiões 88, 89, 90, 91 e 95. A comparação dos resultados obtidos através do MAS-PCR junto com os discordantes resolvidos através do sequenciamento podem ser visualizadas na tabela 3. Com base nessa nova comparação podemos observar que a sensibilidade aumenta para 71,4%. Estes dados agregados indicam que, ao contrário dos dados da literatura, a resistência à ofloxacina (fluroquinolona) nos isolados de *M. tuberculosis* encontrados no Brasil não está relacionada majoritariamente com a mutação na posição 94 do gene *gyrA*.

Tabela 3 - Análise comparativa dos resultados obtidos no MAS-PCR (*gyrA*) junto com sequenciamento e a resistência observada no MGIT

	MGIT			
		Sensível	Resistente	Total
MAS-PCR + SEQ	WT	22	22	44
	Mutado	1	55	56
Total		23	77	100

Legenda: Os resultados obtidos no MAS-PCR (*gyrA* na posição 94) junto com a análise dos discordantes no sequenciamento, foram comparados com a resistência a ofloxacina (fluroquinolona) observada no MGIT.

Em paralelo, também foi realizada a análise do MAS-PCR para o gene *rrs* nas amostras selecionadas, visando a avaliação de sua sensibilidade/especificidade para detectar amostras resistentes à amicacina e canamicina. As discordâncias em relação à resistência e

mutação no gene *rrs* na posição 1401 foram analisadas por sequenciamento, uma vez que existe mutações no gene *rrs* em regiões diferentes daquelas analisadas pelo método MAS-PCR (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise comparativa parcial entre os métodos de MGIT, MAS-PCR e sequenciamento no gene *rrs*

Amostra	Resistência detectada (MGIT)	Classificação	MAS-PCR	SEQUENCIAMENTO	
			<i>rrs</i> (1401)	<i>rrs</i> (1401)	Mutações
1	S, I, R / O	MDR	WT	-	-
2	S, I, R, E / O	MDR	WT	-	-
3	S, I, R / A, O, K	XDR	WT	WT	C1105G
4	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	WT	WT	T1539C
5	I, R / O, K	XDR	WT	WT	-
6	S, I, R, E / O	MDR	WT	-	-
7	S, I, R / O	MDR	WT	-	-
8	S, I, R / O	MDR	WT	-	-
9	I, R, E / O	MDR	WT	-	-
10	S, I, R / O	MDR	WT	-	-
11	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	WT	WT	-
12	I, R	MDR	WT	-	-
13	S, I, R / O	MDR	WT	-	-
14	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	G1484T
15	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	-
16	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	-
17	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	-
18	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	WT	WT	-
19	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	WT	MUT	A1401G
20	S, I, R, E / A	MDR	WT	WT	-
21	S, I, R, E / A	MDR	WT	WT	-
22	I, R / O	MDR	WT	-	-
23	I, R / O	MDR	WT	-	-
24	I, R / O	MDR	WT	-	-
25	S, I, R, E / O	MDR	WT	-	-
26	S, I, R, E / A, O, C	XDR	WT	WT	-
27	I, R / O	MDR	WT	-	-
28	I, R, E / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
29	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
30	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	MUT	A1401G
31	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	C1105G
32	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	WT	MUT	A1401G

33	I, R / O	MDR	WT	-	-
34	I, R / O	MDR	WT	-	-
35	I, R / O	MDR	WT	-	-
36	I, R / O	MDR	WT	-	-
37	I, R / O	MDR	WT	-	-
38	I, R / O	MDR	WT	-	-
39	I, R / A, K	MDR	WT	-	-
40	S, I, R / A, K	MDR	WT	-	-
41	I, R, E / O	MDR	WT	-	-
42	S, I, R, E / O	MDR	WT	-	-
43	I, R / O	MDR	WT	-	-
44	S, I, R, E / O	MDR	WT	-	-
45	S, I, R, E / O	MDR	WT	-	-
46	I, R, E / O	MDR	WT	-	-
47	S, I, R, E / O	MDR	WT	-	-
48	I, R, E / O	MDR	WT	-	-
49	R	Monorresistência	WT	-	-
50	I, R, E / O	MDR	WT	-	-
51	I, R / O	MDR	WT	-	-
52	I, R / O	MDR	WT	-	-
53	I, R / O	MDR	WT	-	-
54	I, R / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
55	S, I, R, E	MDR	WT	-	-
56	I	Monorresistência	WT	-	-
57	I, R	MDR	WT	-	-
58	I, R / O, K	XDR	WT	WT	-
59	I, R / O	MDR	WT	-	-
60	I, R, E / O	MDR	WT	-	-
61	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	-	-	-
62	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
63	S, I, R, E / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
64	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	T1539C
65	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	-
66	S, I, R / A, O, K, C	XDR	WT	-	-
67	S, I, R / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
68	S, I, R / A, O, K	XDR	MUT	-	-
69	I, R / A, K, C	MDR	WT	WT	T1539C
70	I, R / A, K, C	MDR	MUT	-	-
71	I, R / A, O, K, C	XDR	MUT	-	-
72	I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	-
73	I, R / O, K	XDR	MUT	-	-
74	I, R / C	MDR	WT	-	-
75	I, R / C	MDR	WT	-	-
76	I, R / A, O, K, C	XDR	WT	MUT	A1401G
77	I, R / K	MDR	WT	WT	-

78	I, R / O	MDR	WT	-	-
79	I, R / O	MDR	MUT	WT	T1539C
80	I, R / A, O, K, C	XDR	WT	WT	-
81	I, R / K, C	MDR	WT	WT	T1539C
82	I, R / O	MDR	WT	-	-
83	I, R / O	MDR	WT	-	-
84	I, R / A, K	MDR	WT	WT	-
85	I, R / A, C	MDR	WT	WT	-
86	Não possui resistência	Sensível	WT	-	-
87	Não possui resistência	Sensível	WT	-	-
88	Não possui resistência	Sensível	WT	-	-
89	Não possui resistência	Sensível	WT	-	-
90	Não possui resistência	Sensível	WT	-	-
91	Não possui resistência	Sensível	WT	-	-
92	Não possui resistência	Sensível	WT	-	-
93	I, R / O	MDR	WT	-	-
94	S, I, R, E / O, K	XDR	WT	WT	-
95	S, I, R / O	MDR	WT	-	-
96	S, I, R, E / O, A	XDR	WT	WT	-
97	S, I, R / O	MDR	WT	-	-
98	I, R / O	MDR	WT	-	-
99	S, I, R, E / O, C	XDR	WT	WT	T1539C
100	S, I, R, E / O	MDR	WT	-	-

Legenda: S- Estreptomicina/ I- Isoniazida/ R- Rifampicina/ E- Etambutol/ A- Amicacina/ O- Ofloxacina (Fluoroquinolonas) / K- Canamicina/ C- Capreomicina. WT (*Wild type*) - Cepa selvagem (cepa com DNA idêntico à cepa padrão) / MUT- mutado (cepa com DNA com sequência nucleotídica diferente da cepa padrão). MDR – Multidroga resistente/ XDR – Extensivamente resistente.

Nota: O DNA das amostras 39, 40 e 61 não amplificaram na PCR para o gene *rrs* mesmo após quatro tentativas. Porém, essas amostras não foram excluídas do estudo, pois funcionaram para o gene *gyrA*.

A comparação dos resultados obtidos pelo MAS-PCR para o gene *rrs* com a resistência microbiológica para amicacina e/ou canamicina observada no MGIT pode ser visualizada na tabela 5. Com base nessa comparação observamos para a mutação na posição 1401 do gene *rrs* o método MAS-PCR apresenta uma sensibilidade de 25% e uma especificidade de 98,2%. O valor baixo da sensibilidade deve-se ao fato de que algumas amostras resistentes não apresentaram mutação na posição 1401 quando avaliado por este método. Apesar disso, o valor preditivo positivo da análise por MAS-PCR foi de 90,9%, indicando que esta pode ser uma promissora metodologia para a detecção de resistência para amicacina e canamicina.

Tabela 5 - Análise comparativa dos resultados obtidos no MAS-PCR (*rrs*) e a resistência observada no MGIT

	MGIT			
		Sensível	Resistente	Total
MAS-PCR	WT	56	30	86
	Mutado	1	10	11
Total		57	40	97

Legenda: Os resultados obtidos no MAS-PCR (*rrs* na posição 1401) foram comparados com as resistências à amicacina e canamicina observadas no MGIT.

Os resultados discordantes foram resolvidos por sequenciamento, onde foi possível observar a presença de mutações em outras regiões, como nas regiões 1105, 1484, 1539. A comparação dos resultados obtidos através do MAS-PCR junto com os discordantes elucidados através do sequenciamento podem ser visualizadas na tabela 6. Com base nessa nova comparação podemos observar que a sensibilidade aumenta para 52,5% e que o valor preditivo positivo aumenta para 91,3%.

Tabela 6 - Análise comparativa dos resultados obtidos no MAS-PCR (gene *rrs*) junto com sequenciamento e a resistência observada no MGIT

	MGIT			
		Sensível	Resistente	Total
MAS-PCR + SEQ	WT	55	19	74
	Mutado	2	21	23
Total		57	40	97

Legenda: Os resultados obtidos no MAS-PCR (gene *rrs* na posição 1401) junto com a análise dos discordantes no sequenciamento, foram comparados com a resistência a Amicacina e Canamicina observada no MGIT.

7 DISCUSSÃO

A tuberculose é um grave problema de saúde pública, sendo necessário, dentre outras estratégias, que sejam desenvolvidos métodos de diagnósticos cada vez mais rápidos e eficazes de forma a tentar cortar a cadeia de transmissão. O método MAS-PCR é rápido e simples para diagnóstico, podendo ser utilizado como ferramenta preditora da resistência aos antibióticos utilizados no tratamento para cepas extensivamente resistentes a drogas.

No presente trabalho, utilizando a técnica MAS-PCR, foi observado que das 77 cepas analisadas que eram resistentes à fluoroquinolona, o método identificou apenas 36 amostras mutantes quando se analisava a mutação na posição 94 do gene *gyrA* (46,8%). Este valor aparentemente baixo da frequência de mutação não era o esperado, devido ao fato de que estudos, como o de Campbell e colaboradores em 2011 mostraram que a frequência de mutação no gene *gyrA* na posição 94 é de mais de 64% (Campbell *et al.*, 2011).

Uma análise publicada por Laurenzo & Mousa em 2011 também mostrou que aproximadamente de 60-70% das cepas que possuem resistência à fluoroquinolonas, apresentam mutação no gene *gyrA*, sendo o códon 94 a posição com maior frequência de mutação (aproximadamente 60%) (Laurenzo& Mousa, 2011). Na Índia, a frequência de mutação no gene *gyrA* chegou a 95% das cepas resistentes as fluoroquinolonas (Vadwai, Shetty & Rodrigues, 2012).

Um estudo publicado por Hu e colaboradores, na China em 2013, mostrou que 74,5% das cepas com resistência à fluoroquinolona possuíam mutação no gene *gyrA* e com mutação predominante na posição 94, enquanto que nenhuma das cepas que eram sensíveis à fluoroquinolona apresentaram mutação (Hu *et al.*, 2013). Por outro lado, assim como os valores observados em nosso trabalho, uma revisão sistemática realizada por Maruri e colaboradores em 2012, também mostrou que 64% das cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fluoroquinolonas possuíam mutação no gene *gyrA*, sendo a posição 94 a mais prevalente (37%), mostrando que apesar da maioria das cepas resistentes as fluoroquinolonas apresentarem mutação nesse códon, uma proporção substancial não apresenta (Maruri *et al.*, 2012). Estes valores combinados resultam em uma frequência de mutação do gene *gyrA* na posição 94 associada a resistência por fluoroquinolonas de 24%.

Apesar da baixa frequência de mutação da posição 94 em cepas resistentes, a análise estatística dos nossos dados mostrou que o valor preditivo positivo foi elevado (97%), o que significa que a análise por MAS-PCR apenas para essa posição é capaz de identificar com grande acurácia cepas resistentes, podendo ser usado como uma metodologia de triagem para

abordagens microbiológicas. Tal ideia é apoiada pela Organização Mundial de Saúde, que acredita que todas as novas metodologias são complementares as atuais e não substituíveis (WHO, 2016).

A alta correlação entre a resistência a fluoroquinolonas e a mutação na posição 94 do gene *gyrA* encontrada em diversos artigos, mas não em nosso trabalho, pode significar que as cepas circulantes no Brasil apresentem um padrão diverso de mutações. Desta forma, abordagens moleculares que avaliem apenas esta mutação específica não seriam o suficiente para avaliar de forma adequada a resistência a esta classe de antibióticos em isolados brasileiras.

Em uma análise mais detalhada por sequenciamento do gene *gyrA* foi possível observar mutações em outras posições em isolados com resistência a fluoroquinolonas, porém menos frequente que a posição 94 (posições 88, 89, 90, 91 e 95). Com exceção da mutação na posição 95, todas as outras mutações encontradas já foram previamente associadas exclusivamente com perfil de resistência (Campbell *et al.*, 2011). A posição 95, por sua vez, já foi descrita tanto associada com resistência, quanto como marcador populacional de cepas (Vadwai, Shetty & Rodrigues, 2002; Sreevatsan *et al.*, 1997).

Quando analisamos de maneira agregada as mutações pontuais encontradas, observamos uma frequência de 71% de mutações em isolados com resistência as fluoroquinolonas. Isso significa que a resistência as fluoroquinolonas, pelo menos nas cepas circulantes no Brasil, apresentam um padrão adicional de resistência molecular, podendo, por exemplo, ser causada em função de mutações no gene *gyrB*.

Outro objetivo deste trabalho foi avaliar pelo MAS-PCR o gene *rrs* na posição 1401, como preditor de resistência à amicacina e canamicina. Neste trabalho, das 40 cepas resistentes à amicacina e/ou à canamicina analisadas, identificamos pelo método apenas 10 amostras mutantes, quando se analisava mutação na posição 1401 do gene *rrs* (25%). Este valor baixo da frequência de mutação também não era o esperado, já que os estudos como o de Vadwai e colaboradores mostrou que a sensibilidade usando o MAS-PCR na posição 1401 para a detecção de resistência aos aminoglicosídeos foi de 95,8% e a especificidade foi de 98,8% (Vadwai *et al.*, 2012).

Outros estudos, como o de Campbell e colaboradores publicado em 2011 nos Estados Unidos, mostraram que a sensibilidade para detectar resistência à amicacina foi de 90% e para detectar resistência a canamicina foi de 57,7% na posição 1401 no gene *rrs* (Campbell *et al.*, 2011). O mesmo pode ser observado no estudo publicado em 2013 por Hu e colaboradores mostrando que a sensibilidade para detectar resistência à amicacina foi de 86,4% e à

canamicina de 71,9% na também na posição 1401 no gene *rrs* (Hu *et al.*, 2013). No entanto, em nosso estudo, a sensibilidade para detectar resistência à amicacina pelo método MAS-PCR foi de 26% e para detectar resistência à canamicina foi de 28%.

Uma revisão sistemática realizada por Gerghiou e colaboradores em 2012 mostrou que a mutação no gene *rrs* na posição 1401 é a mais comumente reportada nos estudos (Gerghiou *et al.*, 2012). Foi observado que a mutação foi encontrada em 78% das amostras resistentes à amicacina, porém em nenhuma amostra sensível à amicacina. Em amostras resistentes à canamicina, foi observado que 56% possuíam mutação na posição A1401G e que nenhuma amostra sensível à canamicina possuía a mutação.

Estes estudos mostram que a mutação A1401G possui um sensibilidade moderada para detectar resistência à amicacina e canamicina. Porém, também foi possível observar que as mutações associadas à resistência aos fármacos de segunda linha ainda é pouco compreendida em relação as mutações associadas a resistência aos fármacos de primeira linha.

Uma análise por sequenciamento parcial do gene *rrs* realizada em nosso estudo foi possível observar mutações em outras posições, porém menos frequentes que a posição A1401G (posições 1105, T1539C, G1484T). Quando analisamos de maneira agregada as mutações pontuais encontradas através do sequenciamento, observamos uma frequência de 52,5% de mutações em isolados com resistência à amicacina e canamicina. Isso significa que a resistência, pelo menos nas cepas circulantes no Brasil, apresentam um padrão adicional de resistência molecular, podendo, por exemplo, ser causada em função de mutações em outros genes. Assim como na revisão feita por Gerghiou e colaboradores em 2012, é necessário que sejam realizados mais estudos que incluam outros genes associados com resistência a drogas de segunda linha, tais como o gene *tlyA* e o promotor *eis* (Gerghiou *et al.*, 2012).

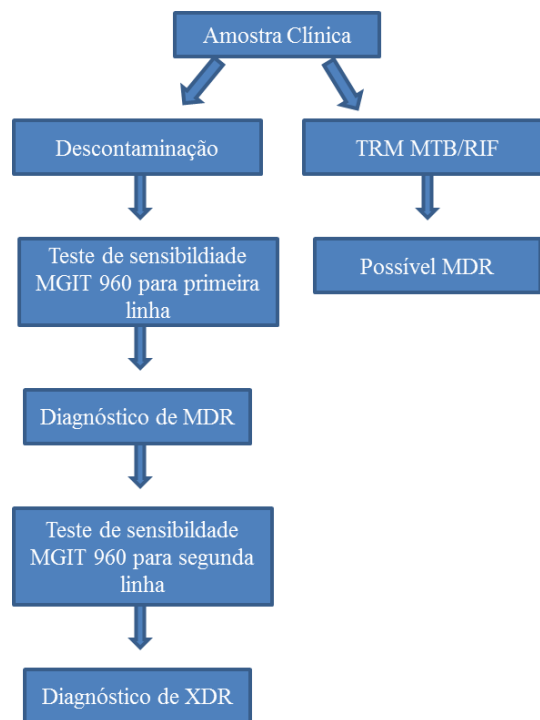
Com base nos dados agregados, apesar da sensibilidade do método ser baixa (*gyrA* 47% e *rrs* 25%), observa-se que o valor preditivo positivo do método MAS-PCR realizado em ambos os genes (*gyrA* e *rr*) foi elevada, sendo 97,3% e 91%, respectivamente. Com base nesses valores, é possível utilizar o método como uma ferramenta de triagem para detectar resistência aos fármacos de segunda linha.

O método pode ser implantado em paralelo ao teste de sensibilidade pelo sistema MGIT 960 para detectar uma possível resistência à fluoroquinolona, amicacina e canamicina, sendo que o teste de sensibilidade tem um tempo médio de 8 a 13 dias. Assim como o Ministério da Saúde recomenda, o uso do Teste Rápido Molecular (TRM) em amostras clínicas para a triagem de uma possível infecção por TB e detecção de resistência à rifampicina em paralelo a

detecção de resistência as drogas de primeira linha através do MGIT 960, proporcionando assim a quebra da cadeia de transmissão.

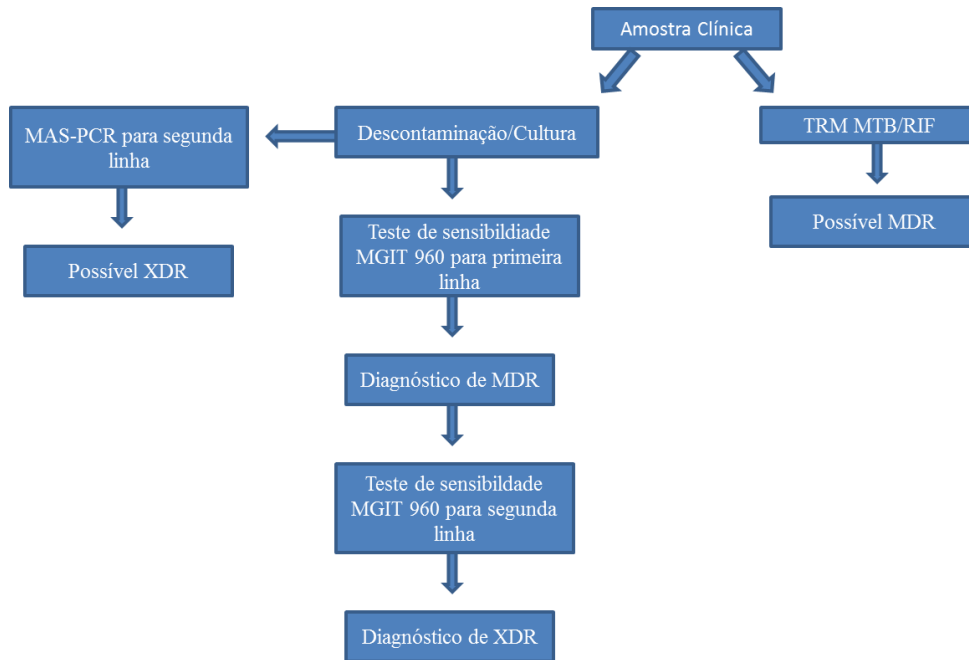
Neste estudo foi realizado a extração de DNA a partir do crescimento da cultura sólida, porém uma possibilidade de mudança no fluxograma de diagnóstico seria a extração de DNA a partir da amostra clínica após o método de descontaminação, diminuindo o tempo da técnica e, fazendo assim, uma triagem de uma possível tuberculose XDR, assim como o TRM faz uma triagem de uma possível tuberculose MDR, conforme observado nas figuras 6 e 7.

Figura 6 - Fluxograma da rotina laboratorial para detecção de resistência a antibióticos em isolados de *Mycobacterium tuberculosis* preconizado pelo Ministério da Saúde



Legenda: Fluxograma da rotina da detecção de MDR e/ou XDR preconizado pelo Ministério da Saúde. MDR – Cepa resistente somente à isoniazida e rifampicina; XDR – Cepa MDR com resistência a uma fluoroquinolona e mais um dos fármacos injetáveis de segunda linha; MGIT - *Mycobacteria Growth Indicator Tube*.

Figura 7 - Sugestão de um novo fluxograma da rotina laboratorial para detecção de resistência a antibióticos em isolados de *Mycobacterium tuberculosis*



Legenda: Fluxograma da proposta de utilização do método MAS-PCR como um método de triagem para uma possível detecção de XDR. MDR – Cepa resistente somente à isoniazida e rifampicina; XDR – Cepa MDR com resistência a uma fluoroquinolona e mais um dos fármacos injetáveis de segunda linha; MGIT - *Mycobacteria Growth Indicator Tube*; MAS-PCR - *Multiplex allele-specific* – PCR.

CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho, observou-se que o método MAS-PCR não seria suficiente para a detecção de resistência aos fármacos de segunda linha (fluroquinolonas, amicacina e canamicina), utilizando como alvos o gene *gyrA* (posição 94) e o gene *rrs* (posição 1401), pois a maioria das cepas analisadas apresentaram mutações em outras posições. Desta forma, nossos dados sugerem que para as cepas circulantes no Brasil seria necessário a seleção de outros genes relacionados com a resistência aos fármacos de segunda linha.

Quando o método foi comparado com o teste de sensibilidade pelo sistema MGIT 960, não foi possível observar um alto nível de concordância. Apesar disto, os valores preditivos permitem propor que o método MAS-PCR seria mais indicado como um método de triagem de detecção de resistência, ao invés de um método substituível.

REFERÊNCIAS

- Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, Small PM. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet*. 1999; 353 (9151): 444-9.
- Braga, J.U. & Trajman, A. Effectiveness of RHZE-FDC (fixed-dose combination) compared to RH-FDC + Z for tuberculosis treatment in Brazil: a cohort study. *BMC Infect Dis*. 2015; 15:81.
- Broude NE, Zhang L, Woodward K, Englert D, Cantor CR. Multiplex Allele-specific target amplification based on PCR suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98 (1): 206-11.
- Brasil, Ministério da Saúde, Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 3ª ed., Rio de Janeiro, 2008.
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose do Brasil. Brasília, 2011.
- Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, Hooks DP, Cowan LS, Plikaytis BB, Posey JE. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55 (5): 2032-41.
- Campos HS. Etiopatologia da tuberculose e formas clínica. *Pulmão RJ* 2006; 15 (1): 29-35
- Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler HT, Meissner G, Mitchison Da, Sula L. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull World Health Organ*. 1963; 29: 565-78.
- Evans J, Segal H. Novel multiplex allele-specific PCR assays for the detection of resistance to second-line drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65 (5): 897-900.
- Freitas FAD, Siqueira HR, Albano RM. Métodos moleculares na tuberculose e resistência do *Mycobacterium tuberculosis*. *Pulmão*. 2009. 18(2): 96-101.
- Georghiou SB, Magana M, Garfein RS, Catanzaro DG, Catanzaro A, Rodwell TC. Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review. *PLoS One*. 2012; 7 (3): e33275.
- Gillespie, SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002. 46 (2): 267-74.
- Hu Y, Hoffner S, Wu L, Zhao Q, Jiang W, Xu B. Prevalence and genetic characterization of second-line drug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Rural China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57 (8): 3857-63.

Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*. 2011; 469 (7331): 483-90.

Laurenzo D, Mousa SA. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic testing. *Acta Trop*. 2011; 119 (1): 5-10.

Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF, Mayer C, Cambau E, Aubry A. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67 (4): 819-31

Mokrousov I, Otten T, Manicheva O, Potapova Y, Vishnevsky B, Narvskaya O, Rastogi N. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52 (8): 2937-9.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. 44(2), 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/11955-boletins-epidemiologicos-arquivos>; Acesso em 10 de Maio de 2016.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Perspectivas brasileiras para o fim da tuberculose como problema de saúde pública. 47(13), 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/11955-boletins-epidemiologicos-arquivos>; Acesso em 10 de Maio de 2016.

Siddiqi, S.H. & Rüsç-Gerdes, S. MGIT™ Procedure Manual For BACTEC™ MGIT 960™ TB System. FIND. 2006. Disponível em: http://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf, Acesso em 10 de Maio de 2016.

Siqueira HR; Vargas TC; Costa W; Faria AC; Lopes AJ; Capone ED; Costa CH & Rufino R. O tratamento atual da tuberculose (para adolescentes e adultos) comentado. *Revist HUPE* 2010; 9 (2): 61-71.

Smith T, Wolff KA, Nguyen L. Molecular biology of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013; 374: 53-80

Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94 (18): 9869-74.

Thrusfield M, Ortega C, de Blas I, Noordhuizen JP, Frankena K. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec*. 2001; 148(18):567-72.

Trabulsi LR; Altertheem F; Gompertz OF; Candeias JAN. *Microbiologia*. 3a ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

Vadwai V, Shetty A, Rodrigues C. Multiplex allele specific PCR for rapid detection of extensively drug resistant tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2012; 92 (3): 236-42.

World Health Organization, 2006a. The Global Plan to Stop TB 2006-2015. Disponível em: http://www.who.int/tb/features_archive/global_plan_to_stop_tb/en/; Acesso em 10 de Maio de 2016.

World Health Organization, 2006b. The Stop TB Strategy. Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69241/1/WHO_HTM_STB_2006.368_eng.pdf; Acesso em 10 de Maio de 2016.

World Health Organization, 2008. Global Tuberculosis Control: Surveillance Planning, Financing. Report. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42889/2/9241562641.pdf>; Acesso em 10 de Maio de 2016.

World Health Organization. 2011 GLOBAL TUBERCULOSIS CONTROL. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44728/1/9789241564380_eng.pdf; Acesso em 10 de Maio de 2016.

World Health Organization, 2014 – World Health Organization, 2104. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/130918/1/9789241548809_eng.pdf; Acesso em 10 de Maio de 2016.

World Health Organization. 2105 GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf; Acesso em 10 de Maio de 2016.

World Health Organization. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/tb/laboratory/en/>; Acesso em 10 de Maio de 2016.